

# G-Proteine und Melanomzellen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor  
medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diana Bergner,  
geboren am 04.02.1979 in Gera.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Norgauer
2. PD Dr. Markert
3. Prof. Dr. Gebicke-Haerter

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3.7.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Melanozytäre Zellen .....	1
1.2 Heterotrimere G-Proteine .....	3
1.2.1 Signaltransduktionsmechanismen.....	4
1.2.2 Bedeutung der heterotrimeren G-Proteine .....	5
1.2.3 Pertussistoxin .....	6
1.3 Monomere G-Proteine und die Familie der Rho-Proteine.....	6
1.3.1 Signaltransduktionsmechanismen.....	7
1.3.2 Bedeutung der monomeren Rho-Proteine.....	10
1.3.3 Rho-Proteine modifizierende Toxine .....	10
1.4 Fragestellung der Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1 Chemikalien und Geräte .....	13
2.2 Oligonukleotide .....	14
2.2.1 DNA-Sequenzen aus Datenbanken.....	14
2.2.2 Oligonukleotide.....	14
2.3 Materialien für die Molekular- und Zellbiologie .....	15
2.3.1 Antikörper, Enzyme, Toxine, Radiochemikalien .....	15
2.3.2 Reagenzien und Kitsysteme.....	16
2.3.3 Materialien für die Zellkultur .....	17
2.4 Zelllinie und Zellkultur .....	17
2.4.1 Melanomzelllinie .....	17
2.4.2 Kultivierung von Melanomzellen .....	18
2.4.3 Bestimmung der Zellzahl.....	18
2.4.4 Einfrieren von Zellen.....	18
2.4.5 Auftauen von Zellen.....	19
2.5 Molekularbiologische Methoden .....	19
2.5.1 RNA-Isolierung .....	19
2.5.2 Reverse Transkription (RT) .....	20
2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	20

2.6	Elektrophoretische Methoden .....	21
2.6.1	<i>DNA-Agarosegelelektrophorese</i> .....	21
2.6.2	<i>Westernblot</i> .....	21
2.6.2.1	Proteinisolierung, Proteinbestimmung .....	22
2.6.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) .....	22
2.6.2.3	Elektroblotting .....	24
2.6.2.4	Detektion .....	24
2.7	Zellbiologische Methoden .....	25
2.7.1	<i>ADP-Ribosylierung und Monoglucosylierung</i> .....	25
2.7.2	<i>Proliferationstests</i> .....	27
2.7.2.1	MTT-Test .....	27
2.7.2.2	Einbau von Bromodesoxyuridin in die DNA .....	27
2.8	Verwendete Software und statistische Verfahren .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	Heterotrimere G-Proteine .....	29
3.1.1	<i>G-Protein-Subtypen</i> .....	29
3.1.2	<i>Nachweis der Pertussistoxinwirkung in Melanomzellen</i> .....	30
3.2	Monomere G-Proteine .....	33
3.2.1	<i>Expression von Rho-Proteinen in Melanomzellen</i> .....	33
3.2.2	<i>Nachweis der Clostridium difficile Toxin B Wirkung in Melanomzellen</i> .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>44</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>45</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>57</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des G-Protein-Zyklus .....	5
Abbildung 2: Modell der ADP-Ribosylierung von G-Proteinen .....	6
Abbildung 3: Regulation des GTPase-Zyklus bei Rho-Proteinen.....	9
Abbildung 4: Modell der Monoglucosylierung von Rho-Proteinen.....	10
Abbildung 5: DNA-Agarosegelelektrophorese der $G\alpha_{i3}$ -, $G\alpha_{i2}$ -, $G\alpha_{16}$ - PCR- Produkte aus Melanomzellen.....	29
Abbildung 6: Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die G-Protein Subtypen $G\alpha_{i2}$ , $G\alpha_{i3}$ , und $G\alpha_{16}$ .....	30
Abbildung 7: Autoradiogramm des Melanomzellenlysats nach ADP- Ribosylierung durch Pertussistoxin.....	31
Abbildung 8: Quantifizierung des Einbaus von Radioaktivität in Melanomzelllysat nach ADP-Ribosylierung durch Pertussistoxin verschiedener Konzentrationen .....	32
Abbildung 9: Einfluß von Pertussistoxin auf die Proliferation von Melanomzellen .....	33
Abbildung 10: Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Rho- Proteine RhoA, RhoB, RhoG, Rac1, Rac2 und Cdc42 .....	34
Abbildung 11: Autoradiogramm des Melanomzelllysats nach ADP-Ribosylierung durch Exotoxin-C3 aus Toxin B-vorbehandelten Melanomzellen.....	36
Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Autoradiogramme .....	37
Abbildung 13: Autoradiogramm des Melanomzelllysats der Monoglucosylierung durch Clostridium difficile Toxin B.....	38
Abbildung 14: Quantitative Auswertung der Autoradiogramme .....	39
Abbildung 15 A/B: Konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Proliferation von Hs294T-Melanomzellen durch Clostridium difficile Toxin B. .....	40

## Abkürzungsverzeichnis

cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumin")
cDNA	komplementäre DNA ("complementary DNA")
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("deoxyribonucleic acid")
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fetales Kälberserum ("fetal calf serum")
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gro $\alpha$	Produkt des wachstumsassoziierten Onkogens $\alpha$ ("growth regulated oncogene $\alpha$ ")
IL-8	Interleukin-8
IL-8R $\alpha$	Interleukin-8 Rezeptor $\alpha$
IL-8R $\beta$	Interleukin-8 Rezeptor $\beta$
kbp	Kilobasenpaar(e)
mRNA	'messenger' Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulfate")
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ("Standard error of the mean")
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan

UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

## Zusammenfassung

Zellfunktionen wie Proliferation, Migration und Adhärenz, die für die Entstehung von Tumoren und die anschließende Metastasierung verantwortlich sind, werden unter anderem durch G-Protein-vermittelte Signaltransduktionskaskaden kontrolliert. Neben den schon länger bekannten heterotrimeren G-Proteinen sind hieran auch kleine, monomere G-Proteine beteiligt.

Über das Vorkommen sowie die regulativen Funktionen von großen, heterotrimeren G-Proteinen und von kleinen, monomeren G-Proteinen in melanozytären Zellen ist jedoch wenig bekannt.

Da bisher noch nicht festgestellt wurde, welche G-Protein-Subtypen in Melanomzellen exprimiert werden, sollte in dieser Arbeit die Expression von heterotrimeren G-Proteinen der Subtypen  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  und  $G\alpha_{16}$  sowie von monomeren G-Proteinen der Rho-Familie in Hs294T-Melanomzellen nachgewiesen werden. Anschließend sollte die Modifikation dieser G-Proteine in Melanomzellen durch Toxine und deren Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression heterotrimerer G-Proteine auf RNA-Ebene durch RNA-Isolierung, Reverse Transkription, PCR und anschließende DNA-Elektrophorese sowie auf Proteinebene durch Proteinisolierung und -detektion mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot untersucht.

Wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der Funktion der G-Proteine waren und sind verschiedene Toxine. Das Pertussistoxin aus *Bordetella pertussis* blockiert  $G\alpha_i$ -Proteine durch ADP-Ribosylierung. Die konzentrationsabhängige Modifizierung der  $G\alpha_i$ -Proteine in Hs294T-Melanomzellen durch Pertussistoxin wurde in ADP-Ribosylierungsversuchen untersucht. Anschließend wurde der Einfluss auf die Zellproliferation im MTT-Test kontrolliert.

Da bisher ebenfalls keine Daten darüber vorlagen, welche monomeren G-Proteine in Melanomzellen exprimiert werden, wurde dies durch Proteinisolierung und -detektion mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot auf Proteinebene untersucht. Das Toxin B aus *Clostridium difficile* inaktiviert alle Rho-Proteine durch Monoglucosylierung, das Exoenzym C3 aus *Clostridium botulinum* modifiziert RhoA, -B und -C durch ADP-Ribosylierung. Durch den



Einsatz dieser Toxine wurde die zeit- und konzentrationsabhängige Modifizierung von Rho-Proteinen sowie deren Einfluss auf die Proliferation der Melanomzellen untersucht.

Mit dieser Arbeit konnten die Pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren G-Protein-Subtypen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$  sowie das Pertussistoxin-insensitive  $G\alpha_{16}$  in Melanomzellen auf RNA- und auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die  $G\alpha_i$ -Proteine wurden durch Pertussistoxin ADP-ribosyliert. Mit Hilfe des MTT-Tests konnte dargestellt werden, dass dadurch die Proliferation der Melanomzellen unterdrückt wurde. Aufgrund dieser Befunde kann man davon ausgehen, dass in Melanomzellen die  $G\alpha_i$ -Protein-Subtypen durch Pertussistoxin ADP-ribosyliert werden und dadurch die Fähigkeit zur Zellproliferation abnimmt.

Zum anderen konnten auch die kleinen, monomeren G-Proteine der Rho-Familie (RhoA, RhoB, RhoG, Rac1 und Cdc42) in Melanomzellen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Durch Clostridium difficile Toxin B wurden diese G-Proteine der Rho-Familie modifiziert. Diese Modifizierungen bewirkten bei den Melanomzellen eine Abnahme der Proliferation, die mit dem Bromodesoxyuridineinbau-Test nachgewiesen wurde. Mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass Clostridium difficile Toxin B in die Melanomzellen eindringen, sowohl RhoA, -B und -C als auch RhoG, Rac-1, Cdc42 und TC10 modifizieren und somit die Proliferationsrate der Hs294T-Melanomzellen senken kann.

Die mit dieser Arbeit nachgewiesene selektive Ausschaltung von essentiellen Signaltransduktionsproteinen mit Hemmung der Zellproliferation in Melanomzellen könnte ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieoptionen beim malignen Melanom sein.

# 1 Einleitung

## 1.1 Melanozytäre Zellen

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar und wird dadurch von vielen Umweltfaktoren direkt beeinflusst. Aufgebaut ist die Haut aus drei Schichten. Die oberste Schicht ist die Epidermis (Oberhaut), die ein klassisches Proliferationsgewebe darstellt, d.h. sie unterliegt einer ständigen Erneuerung. Die darunterliegende Dermis (Lederhaut) wird durch eine Basalmembran von der Epidermis getrennt. Die unterste Schicht stellt das subkutane Fettgewebe dar. In den einzelnen Schichten herrschen unterschiedliche Zelltypen vor.

Die dominierende Zellpopulation der Epidermis sind die Keratinozyten. Daneben kommen in deutlich geringerer Zahl Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen vor. Die Zellen der Dermis (Fibroblasten, Mastzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Nervenzellen) sind eingebettet in eine gelartige Grundsubstanz, die von Bindegewebsfasern durchzogen wird. Das subkutane Fettgewebe besteht aus Fett-, Nerven-, Endothel- und glatten Muskelzellen. Die verschiedenen Zelltypen der Oberhaut besitzen unterschiedliche Funktionen. Die Hornhaut entsteht durch die Umwandlung von Keratinozyten in tote Hornzellen. Die Keratinozyten und die aus ihnen entstehende Hornhaut sorgen damit für eine mechanische Stabilisierung der Oberhaut und eine Schutzbarriere gegen Umwelteinflüsse. Über die Merkel-Zellen ist wenig bekannt. Sie besitzen wahrscheinlich eine sensorische Funktion. Langerhans-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen, die vom Knochenmark in die Haut einwandern und sich dort zu Langerhans-Zellen differenzieren. Sie haben eine immunologische Funktion (McKee 1996).

Melanozyten sind sekretorische Zellen die während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste in die Epidermis einwandern. Sie kommen in der Basalschicht der Epidermis, in Haarfollikeln und im Auge vor. Melanozyten synthetisieren und speichern Melanin in Melanosomen und geben diese über lange dendritische Fortsätze auch an benachbarte Keratinozyten ab. Die strukturelle und funktionelle Einheit aus Melanozyt und der mit ihm verbundenen Keratinozyten heißt epidermale Melanineinheit. Im Mittel versorgt

ein Melanozyt 36 Keratinozyten. In der Haut von Erwachsenen kommt es nur selten zu Mitosen von Melanozyten. Durch UV-Bestrahlung oder bei der Heilung von großen Wunden können Melanozyten zur Proliferation und Migration angeregt werden. Die Regulation dieser Vorgänge (die Migration während der Embryogenese und Wundheilung, die Proliferation, die Rate der Melaninsynthese und Abgabe der Melanosomen an Keratinozyten) ist weitgehend unbekannt. Da Melanozyten außerdem zahlreiche Zytokine produzieren, ist zu vermuten, dass sie auch Funktionen innerhalb des Immunsystems ausüben (De Luca et al. 1994; Marchisio et al. 1997; Abdel Naser et al. 2003).

Das maligne Melanom ist ein aggressiver metastasierender Tumor, der sich aus transformierten Melanozyten ableitet. Es entsteht vor allem aus den angeborenen oder den erworbenen benignen melanozytären oder dysplastischen Nävuszellnävi der Haut, selten dagegen innerhalb eines blauen Nävus oder in anderen Organen (McKee 1996).

Das weltweite Auftreten dieses Tumors nimmt gegenwärtig zu (Garbe und Blum 2001). Das maligne Melanom kommt überwiegend bei hellhäutigen Menschen mit geringem natürlichem Sonnenschutz vor. Epidemiologische Studien und Tierexperimente lassen einen Zusammenhang zwischen Ultraviolettstrahlung und der Entstehung des malignen Melanoms vermuten (Garbe 1992; Singh et al. 1995). Ein Charakteristikum dieses Tumors ist seine Tendenz zur Metastasierung. Sie erfolgt lymphogen in die regionalen Lymphknoten und hämatogen in die Leber, das Herz, die Knochen, das Gehirn und die Lunge (McKee 1996). Die Wahrscheinlichkeit der erfolgten Metastasierung korreliert mit der Tumordicke. Eine sichere Heilung ist derzeit nur durch eine frühzeitige, totale operative Entfernung des Primärtumors möglich. Die Überlebensrate bei Existenz von Metastasen ist gering (Garbe & Eigentler 2004).

Ein Merkmal kultivierter Melanomzellen ist im Gegensatz zu Melanozyten ihr autonomes Wachstum. Melanomzellen produzieren und sezernieren größere Mengen der von ihnen benötigten Wachstumsfaktoren (Shih & Herlyn 1993; Satyamoorthy & Herlyn 2002). In diesem Zusammenhang am besten untersucht sind der basische Fibroblastenwachstumsfaktor und die sogenannten CXC-Chemokine wie zum Beispiel das  $\text{Gro}\alpha$  (growth regulated oncogene  $\alpha$ ). Antikörper gegen diese Faktoren oder ihre Rezeptoren blockieren das autonome Wachstum von Melanomzellen (Becker et al. 1989; Becker et al.

1992). Bei der Metastasierung von Melanomzellen spielen mehrere voneinander unabhängige Zellfunktionen wie die Zelladhäsion, Bewegungsvorgänge und die Sekretion von Proteasen eine Rolle (Stetler-Stevenson et al. 1993). Die Zellen müssen sich während des Metastasierungsprozesses aus dem Verband des Primärtumors lösen und sich während der Verbreitung aber immer wieder an Bestandteile der extrazellulären Matrix oder/und andere Zellen anheften (Nip et al. 1992). Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Produktion der sogenannten Matrix-Metalloproteinasen. Dabei handelt es sich um Endopeptidasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes auflösen und damit eine Ausbreitung der Tumorzellen ermöglichen (Bafetti et al. 1998; Stetler-Stevenson et al. 1993). Das Anhaften der Zellen erfolgt weitgehend durch Interaktionen mit der Matrix über Proteine der Integrinfamilie (Rezeptoren für Kollagene, Vitronektin, Fibronektin, Laminin, Fibrinogen, u.a.). Die Expression des Vitronektin-Rezeptors ( $\alpha_v\beta_3$ ) bzw. die Expression der  $\beta_3$ -Untereinheit scheint dabei ein wichtiger Schritt beim Übergang vom radialen (flächigen) zum vertikalen Wachstum der Tumorzellen zu sein und beim Eindringen aus der Epidermis in die Dermis und tiefer gelegene Gewebe eine große Rolle zu spielen (Hsu et al. 1998; Natali et al. 1997). Weitere Adhäsionsmoleküle sind Selektine, Cadherine und Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, wie dem interzellularen Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) (Cotran & Mayadas-Norton 1998; Elangbam et al. 1997; Siegel & Malmsten 1997).

## **1.2 Heterotrimere G-Proteine**

Es gibt zwei große Proteinfamilien, die zu den G-Proteinen (Guaninnukleotid-bindende Proteine) gehören.

Die erste Gruppe sind die schon länger bekannten heterotrimeren G-Proteine. Diese bestehen aus je einer  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ - Untereinheit und sind an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert (Hepler u. Gilman, 1992). Diese G-Proteine werden nach ihrer  $\alpha$ -Untereinheit klassifiziert. Derzeit sind mindestens 19 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen bekannt. Die einzelnen Subtypen werden mit  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12}$  bezeichnet. Bis heute sind mindestens 4  $\beta$ - und 7  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert (Pennington, 1995).

### 1.2.1 Signaltransduktionsmechanismen

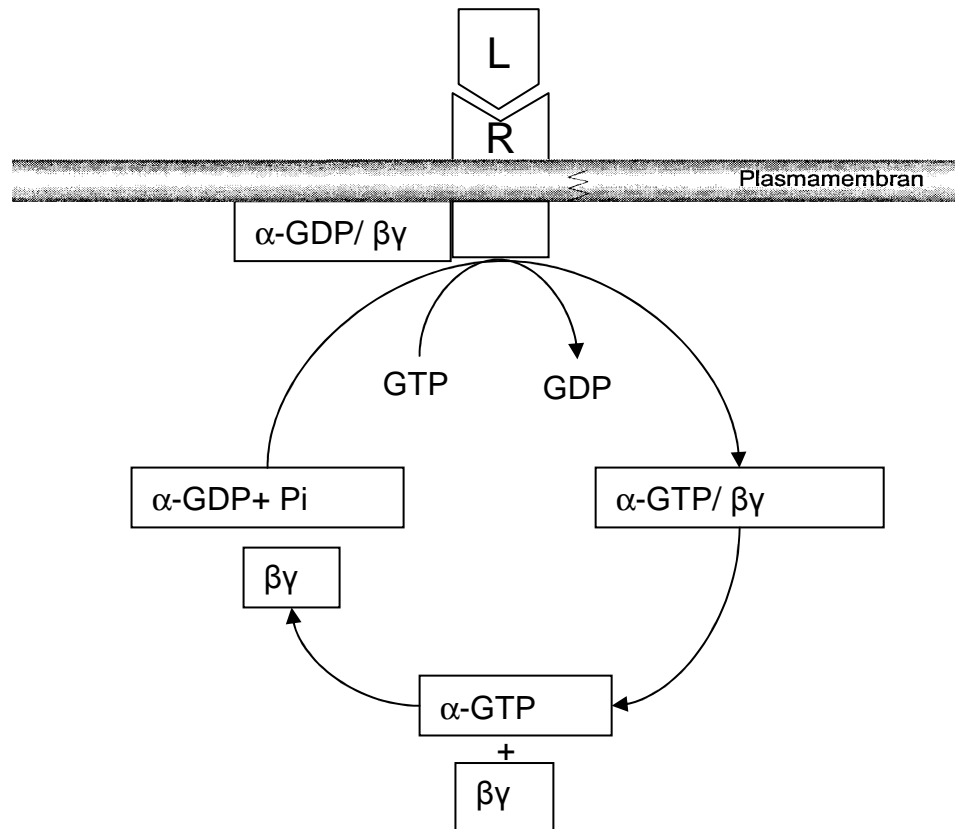
Die heterotrimeren G-Proteine spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion von Serpentinrezeptoren, diese Rezeptoren interagieren an der Innenseite der Zellmembran mit G-Proteinen und leiten ihre Signale mit Hilfe dieser G-Proteine weiter und werden daher auch als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bezeichnet. Diese Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie 7  $\alpha$ -helikale Durchgänge durch die Membran besitzen.

Zu dieser Rezeptorklasse gehören die adrenergen und muscarinisch-cholinergen Rezeptoren, der Glucagon-Rezeptor, das Rhodopsin und viele Geruchs- und Geschmacksrezeptoren sowie auch der Interleukin-8 Rezeptor  $\alpha$  (IL-8R $\alpha$ ) und Interleukin-8 Rezeptor  $\beta$  (IL-8R $\beta$ ) (Damaj et. al. 1996). Insgesamt sind mehr als 1000 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannt. Alle bislang untersuchten Serpentinrezeptoren interagieren an der Innenseite der Zellmembran mit G-Proteinen (Kelvin et al. 1993; Baggiolini et al. 1993; Bourne, 1997; Patel 2004).

Nach Bindung eines Liganden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert dieser das G-Protein. In der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (G $\alpha$ ) kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP. Das G-Protein löst sich vom Rezeptor und der Komplex dissoziiert in GTP-G $\alpha$  und G $\beta\gamma$ . Beide Komponenten können ihrerseits Signale weiterleiten. Bekannte Effektoren der aktivierten G-Proteine sind die Adenylat-Cyclase und die Phospholipase-C3. Die Adenylat-Cyclase katalysiert die Umsetzung von ATP zu cAMP und die Phospholipase-C3 spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat. Die drei Produkte dieser beiden Enzyme sind sekundäre Boten, welche eine Vielzahl von Signalwegen beeinflussen.

Durch Hydrolyse des GTP wird G $\alpha$  wieder inaktiviert und reassoziert mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex zum inaktiven G-Protein.

Diesen Mechanismus der Aktivierung durch Austausch von GDP gegen GTP und der Inaktivierung durch Hydrolyse des GTP haben die heterotrimeren G-Proteine mit den monomeren, kleinen G-Proteinen gemeinsam.



**Abbildung 1: Schema des G-Protein-Zyklus**

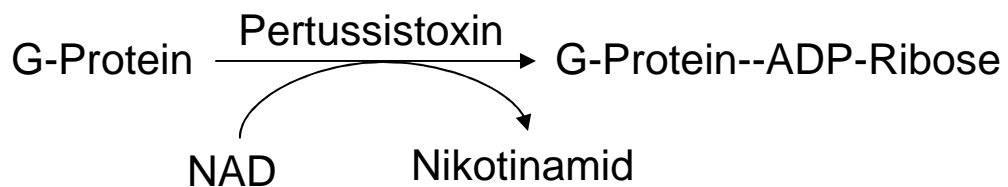
*L: Ligand, R: Rezeptor, α: α-Untereinheit, βγ: βγ-Dimer*

### 1.2.2 Bedeutung der heterotrimeren G-Proteine

Bedeutende Zytokine, welche an den G-Protein-gekoppelten IL-8 Rezeptor  $\beta$  mit hoher Affinität binden, sind Interleukin 8 und Gro $\alpha$  (growth regulated oncogene  $\alpha$ ) (Schraufstatter et al. 1993; Damaj et. al. 1996). Interleukin 8 und Gro $\alpha$  sind autokrine Wachstumsfaktoren fur Melanomzellen (Luan et al. 1997; Schadendorf et al. 1993). Weiterhin gibt es Hinweise, dass die genannten G-Protein-vermittelten Signaltransduktionskaskaden an der Regulation der Zellfunktionen wie Migration, Adharenz, Phagozytose und Sauerstoffradikalproduktion beteiligt sind (Norgauer et al. 1988; Norgauer et al. 1989). Welchen Beitrag jede einzelne fur eine jeweilige Zellfunktion leistet, und ob und wie sie sich gegenseitig beeinflussen, ist weitgehend unbekannt.

### 1.2.3 Pertussistoxin

Das Toxin von *Bordetella pertussis* inaktiviert in Zellen  $G\alpha_{i2}$  und  $G\alpha_{i3}$  durch ADP-Ribosylierung an einem Cysteinrest. Es beeinflusst jedoch nicht die Funktion von  $G\alpha_{i6}$  (Gierschik et al. 1992; Wu et al. 1993; Kupper et al. 1992). Dabei wird Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) in Nicotinamid und ADP-Ribose gespalten (Abb.3). Der ADP-Riboserest wird auf ein Zielprotein übertragen. Vermutlich aufgrund sterischer Hinderung können ADP-ribosylierte  $G\alpha_i$ -Proteine nicht mehr mit den entsprechenden Rezeptoren interagieren. Dadurch wird die biologische Funktion der  $G\alpha_i$ -Subtypen durch Pertussistoxin selektiv inaktiviert.



**Abbildung 2: Modell der ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch Pertussistoxin**

### 1.3 Monomere G-Proteine und die Familie der Rho-Proteine

Die zweite Gruppe von G-Proteinen sind die kleinen, monomeren G-Proteine mit einem Molekulargewicht um 21 kDa. Als erster Vertreter wurde 1981 das G-Protein Ras (von "Rat Sarcoma Virus") entdeckt (Shilo und Weinberg 1981). Als 1982 entdeckt wurde, dass Mutationen im ras Gen bei der Entwicklung von Tumoren beim Menschen beteiligt sind (Barbacid 1990; Chang et al. 1982; Ganguly et al. 1990; Strassheim et al. 2000), stieg das Interesse an diesem Protein stark an. In der Folge wurden mehr als 70 Proteine entdeckt, die zur Superfamilie der Ras homologen Proteine gezählt werden. Die Unterteilung erfolgt heute in mindestens 5 Unterfamilien: Ras, Rab, Arf, Ran und Rho (Ras Homologie). Die einzelnen Familien zeigen eine ca. 30%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Innerhalb der Rho-Familie besteht eine Sequenzidentität von mindestens 50%. Besonders konserviert sind die Regionen, die für die Nukleotidbindung verantwortlich sind. Ras-Proteine sind bei der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt, Rab- und Arf-

Proteine beim Vesikeltransport. Vertreter der Ran-Unterfamilie kontrollieren viele Transportprozesse an der Kernmembran (Takai et al. 2001).

Vertreter der Rho-Familie wurden ursprünglich nur mit der Regulation des Aktinzytoskeletts in Verbindung gebracht. Mittlerweile hat sich aber gezeigt, dass die Rho-Proteine an sehr vielen Zellfunktionen beteiligt sind, die nicht unmittelbar mit dem Zytoskelett in Zusammenhang stehen. So wurde mehrfach beschrieben, dass sie an der Kontrolle des Wachstums beteiligt sein sollen (Philips et al. 2000; Scita et al. 2000). Das erste Rho-Protein wurde 1985 in *Apiysia californica* entdeckt (Madaule und Axel 1985). Mindestens 10 Vertreter werden heute in Säugetieren zur Familie der Rho-Proteine gerechnet: RhoA, -B, -C, -D, -E, -G, Rac1 und -2, Cdc42, (G25K) und TC10. Die am besten untersuchten Vertreter sind RhoA, -B, -C (häufig kollektiv als "Rho" bezeichnet), Rac1 und -2 ("Rac") und Cdc42. RhoA wird wahrscheinlich in allen Geweben exprimiert. RhoB wird ebenfalls ubiquitär exprimiert und akkumuliert in der S-Phase des Zellzyklus (Zalcman et al. 1995). RhoC wird in Tumoren häufig überexprimiert (Reid et al. 1996; Suwa et al. 1998). Rac1, Cdc42 und RhoG werden ubiquitär exprimiert, RhoG aber besonders stark in der Lunge und der Plazenta. Die mRNA von RhoG akkumuliert in der G1-Phase des Zellzyklus (Vincent et al. 1992). Rac2 wird dagegen nur in Zellen der hämatopoetischen Linie nachgewiesen (Dorseuil et al. 1996; Roberts et al. 1999). TC10 wird am stärksten in Herz- und Skelettmuskeln exprimiert (Neudauer et al. 1998) und könnte eine Rolle bei der Bildung und Regeneration von Axonen in Nervengewebe spielen (Tanabe et al. 2000). Über RhoD und RhoE ist noch wenig bekannt (Foster et al. 1996; Guasch et al. 1998).

### **1.3.1 Signaltransduktionsmechanismen**

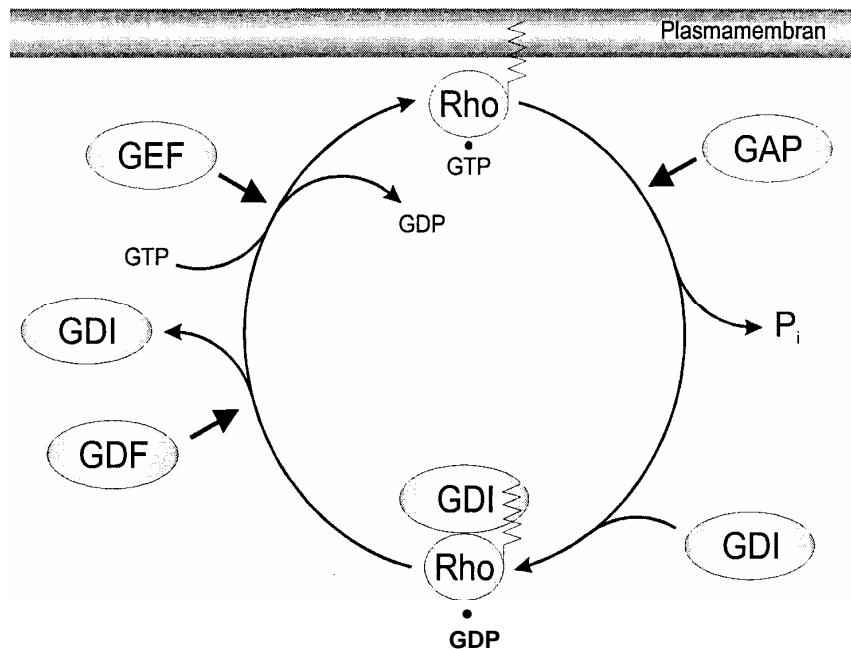
Lange Zeit war die Verbindung zwischen den Stimuli bzw. deren Rezeptoren und der Aktivierung der Rho-Proteine unbekannt. Hinweise wurden durch die Untersuchung heterotrimerer G-Proteine gewonnen. (Buhl et al. 1995). Die Stimulation mit Thrombin führt zur Aktivierung eines G-Proteins mit  $G\alpha_{13}$ -Untereinheit. Der für Rho spezifische Austauschfaktor p115RhoGEF besitzt eine RGS-Sequenz ("regulator of G-Protein signaling domain"), über die er die intrinsische GTPase von  $G\alpha_{13}$  stimulieren kann. Aktiviertes  $G\alpha_{13}$  stimuliert seinerseits die Fähigkeit von p115RhoGEF den Nukleotidaustausch an Rho zu katalysieren (Hart et al. 1998; Kozasa et al. 1998). Durch diese



Wechselwirkungen kommt es einerseits zur Inaktivierung von  $G\alpha_{13}$  und andererseits zur Aktivierung von Rho. Die Aktivierung bestimmter Austauschfaktoren durch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine soll zur Aktivierung von Rac führen (Kiyono et al. 1999; Seasholtz et al. 1999; Sun et al. 1999). Eine Aktivierung von Rho-Proteinen scheint aber auch durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie möglich zu sein (Kjoller & Hall 1999).

Alle Rho-Proteine haben, wie die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, im inaktiven Zustand GDP gebunden und liegen im Zytoplasma vor (Adamson et al. 1992). Sie bilden dort einen Komplex mit einem stabilisierenden Protein, einem sogenannten "GDP Dissoziationsinhibitor" (GDI) (Ohga et al. 1989; Olofsson 1999; Sasaki et al. 1993). Bevor das Rho-Protein aktiviert werden kann, muss es wahrscheinlich aus diesem Komplex freigesetzt werden. Dafür wird ein Dissoziationsfaktor benötigt. Die ERM-Proteine (ERM für die drei bisher beschriebenen Vertreter Ezrin, Radixin und Moesin) sind eine Gruppe von Proteinen, die unter anderem diese Funktion ausüben (Bretscher 1999; Takahashi et al. 1997; Takahashi et al. 1998). Nach Freisetzung des Rho-Proteins erleichtern Austauschfaktoren ("guanine nucleotide exchange factor", GEF oder "guanine nucleotide dissociation factor", GDS) die Dissoziation des Guaninnukleotids (Hori et al. 1991; Kikuchi et al. 1992; Takahashi et al. 1998). Aufgrund des Konzentrationsverhältnisses von [GDP]:[GTP] von ca. 1:5 im Zytoplasma, wird dadurch GDP gegen GTP ausgetauscht. Im aktivierten Zustand (GTP-Form) lokalisieren einige Rho-Proteine an der Zytoplasmamembran, andere an intrazellulären Membranen (Adamson et al. 1992). In der GTP-gebundenen Form leiten die G-Proteine Signale an ihre Effektoren weiter, bis durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität die Hydrolyse des gebundenen GTP erfolgt. Auch dieser Vorgang wird durch einen entsprechenden Faktor ("GTPase activating protein", GAP) stimuliert (Settleman et al. 1992). Die inaktivierte Form des G-Proteins ist wieder ein Substrat für ein entsprechendes GDI-Protein. Durch die Komplexbildung wird das Rho-Protein von der Membran abgelöst ("extrahiert") und zurück ins Zytoplasma transportiert. Dieses Pendeln zwischen Membranen und Zytoplasma, in Abhängigkeit von der Aktivierung, ist typisch für die Rho-Proteine (Adamson et al. 1992; Bokoch et al. 1994; Hori et al. 1991; Isomura et al. 1991). Das Pendeln findet sich aber auch bei einigen Vertretern anderer

Unterfamilien der Ras Superfamilie. Der Namensgeber der Superfamilie, das Ras-Protein, liegt wahrscheinlich unabhängig vom Aktivierungszustand an der Zytoplasmamembran vor. Ein Pendeln zwischen Kernplasma und Zytoplasma tritt wahrscheinlich bei Ran-Proteinen auf.



**Abbildung 3: Regulation des GTPase-Zyklus bei Rho-Proteinen**

Die Aktivierung der Rho-Proteine wird über Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) vermittelt. In der GTP-gebundenen Form können Rho-Proteine mit ihren Effektoren interagieren. GTPase aktivierende Proteine (GAP) stimulieren die Hydrolyse des GTP und damit die Inaktivierung des G-Proteins. Die inaktive Form liegt im Zytoplasma an GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) gebunden vor. Durch GDI-Dissoziationsfaktoren (GDF) wird das Rho-Protein aus diesem Komplex freigesetzt. Während des Aktivierungs-/Deaktivierungszyklus kommt es zum Pendeln des Rho-Proteins zwischen Membran- und Zytoplasmafraktion (Kaibuchi et al.1999).

Für Ras-Proteine wurden bisher nur wenige regulierende Faktoren (GDI, GEF, GDF und GAP) und Effektoren beschrieben. Im Gegensatz dazu sind für Vertreter der Rho-Familie eine Vielzahl verschiedener Regulatoren und Effektoren bekannt (Kaibuchi et al. 1999; Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997). Einige der regulierenden Proteine beeinflussen alle (z.B. rhoGDI), andere nur

ein oder zwei Mitglieder der Rho-Familie. Viele dieser Daten wurden durch *in vitro* Versuche erhalten und in letzter Zeit zeigte sich, dass die Spezifität *in vivo* meist höher liegt (Montaner et al. 1998).

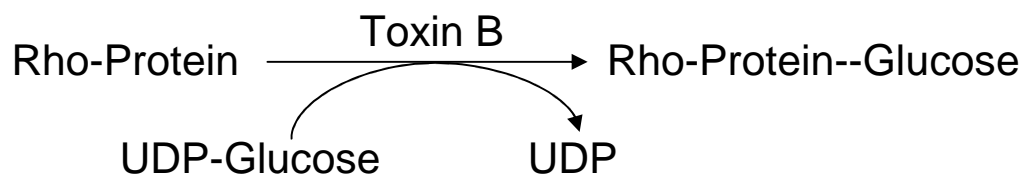
### 1.3.2 Bedeutung der monomeren Rho-Proteine

Die kleinen, monomeren GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) der Rho-Familie regulieren den Umbau des Aktinzytoskeletts. Dieses ist essentiell beteiligt an allen Bewegungsvorgängen der Zellen, der Zellmorphologie, der Adhäsion an Oberflächen, Zell-Zell-Kontakten, beim Vesikeltransport, der Chemotaxis und der Kontraktion von glatten Muskelzellen. Neben diesen Funktionen, an denen das Aktinzytoskelett beteiligt ist, üben die Rho-Proteine über ein komplexes Netzwerk von Interaktionen auch einen Einfluß auf Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, und die Kontrolle der Transkription aus (Kaibuchi et al. 1999; Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997; Philips et al. 2000; Scita et al. 2000).

### 1.3.3 Rho-Proteine modifizierende Toxine

Wichtige Hilfsmittel bei der Aufklärung der Bedeutung der Rho-Proteine waren und sind verschiedene Toxine.

Die Toxine von *Clostridium difficile* (Toxin A und B) sind Monoglucosyltransferasen mit Substratspezifität für alle Rho-Proteine (Just et al. 1994; Just et al. 1995a; Just et al. 1995b). Das letale Toxin aus *Clostridium sordellii* ist ebenfalls eine Monoglucosyltransferase. Neben Rho-Proteinen werden zusätzlich Ras und Rap modifiziert (Genth et al. 1996; Just et al. 1996). Die Glucosylierung durch diese Toxine erfolgt an Threonin-37 bei RhoA, RhoB und RhoC und an Threonon-35 bei den anderen Substraten. Der Haupteffekt auf die Rho-Proteine ist die vollständige Hemmung der Interaktion mit ihren Effektoren (Herrmann et al. 1998; Sehr et al. 1998).



**Abbildung 4: Modell der Monoglucosylierung von Rho-Proteinen  
durch *Clostridium difficile* Toxin B**

Aus *Clostridium botulinum* wurde das Exoenzym-C3 isoliert und kloniert (Nemoto et al. 1991). Dabei handelt es sich um eine ADP-Ribosyltransferase, die nur RhoA, RhoB und RhoC modifiziert. Die Akzeptoraminosäure Asparagin-41 (Sekine et al. 1989) liegt in der sogenannten Effektor-domäne des Rho-Proteins. Die Modifikation führt zu einer Blockade Rho-abhängiger Signalwege (Aktories et al. 1992; Mohr et al. 1992; Sehr et al. 1998).

Eine dritte Gruppe bakterieller Toxine besteht aus den zytotoxisch nekrotisierenden Faktoren CNF1 und CNF2 von *Escherichia coli* (Fiorentini et al. 1995; Oswald et al. 1994) und dem dermonekrotischen Toxin (DNT) von *Bordetella bronchiseptica* (Horiguchi et al. 1995). Diese Toxine modifizieren Rho-Protein durch Deamidierung eines Glutaminrestes (Flatau et al. 1997; Schmidt et al. 1997) und bewirken eine Aktivierung der Rho-Proteine. Die anfängliche Vermutung, dass nur RhoA, RhoB und RhoC modifiziert werden, hat sich nicht bestätigt. Wahrscheinlicher ist, dass alle Mitglieder der Rho-Familie ein Substrat dieser Toxine darstellen (Flatau et al. 2000; Lerm et al. 1999).

## **1.4 Fragestellung der Arbeit**

Melanozyten sind sekretorische Zellen der Epidermis, die über die Wechselwirkung mit Keratinozyten für die Bräunung der Haut verantwortlich sind. Die Bräunung der Haut stellt einen Schutzmechanismus gegen intensive Sonneneinstrahlung dar. Transformierte Melanozyten bzw. Melanomzellen proliferieren unkontrolliert und führen zum malignen Melanom (McKee 1996).

Dieser Tumor endet im fortgeschrittenen Stadium aufgrund der hohen Metastasierungsaktivität und der großen Widerstandsfähigkeit von Melanomzellen gegen die Zytostatika-Therapie meist letal. Eine erfolgreiche Therapie ist derzeit nur durch eine operative Entfernung des Primärtumors vor der ersten Metastasierung möglich (Garbe & Eigentler 2004).

Für das Wachstum und die Metastasierung von Melanomzellen spielt die Expression verschiedener Rezeptoren, Enzyme und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Beispiele dafür sind die Wachstumsfaktoren  $G\alpha$  und Interleukin-8, die an den G-Protein-gekoppelten Interleukin-8-Rezeptor binden (Schraufstatter et al. 1993; Damaj et al. 1996; Luan et al. 1997).

Die Transformation vieler Zellen zu Tumorzellen erfolgt durch mutierte Formen des kleinen G-Proteins Ras. Rho-Proteine spielen bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle (Chang et al. 1982; Barbacid 1990; Ganguly et al. 1990; Strassheim et al. 2000).

Über das Vorkommen sowie die regulativen Funktionen von heterotrimeren, „großen“ G-Proteinen und von monomeren, „kleinen“ G-Proteinen in melanozytären Zellen ist noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit sollte die Expression von heterotrimeren G-Proteinen der Subtypen  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  und  $G\alpha_{i6}$  sowie von monomeren G-Proteinen der Rho-Familie in Hs294T-Melanomzellen nachgewiesen werden.

Anschließend sollte die Modifikation dieser G-Proteine in Melanomzellen durch Toxine und deren Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit gezeigt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Geräte

#### Chemikalien

Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose	Gibco, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin (86%ig)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	Gibco, Eggenstein
Ponceau-S	Serva, Heidelberg
Salzsäure (37%ig)	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg

## Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Typ</u>	<u>Hersteller</u>
Blotting-Apparatur	Mini Trans Blot	BioRad, München
Elektrophoresekammer	Mini Protean II	BioRad, München
ELISA-Reader	Molecular Devices I	MWG Biotech, Ebersberg
Entwicklungsgerät	Optimax	Siemens, München
Eppendorf-Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Gel-Printer	Typ I	MWG Biotech, Ebersberg
Inkubator	IG 150	Jouan, Stadthagen
Kühlzentrifuge	RC3B	Sorvall, Bad Homburg
Laminar-Flow-Werkbank	LaminAir HB2472	Heraeus, Hanau
PCR-Gerät	Mastercycler 5330	Eppendorf, Hamburg
Phosphorimager	Phosphorimager SF	Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA/USA
Photometer	Genequant II	Pharmacia, Freiburg
Schüttelwasseranlage	GFL 1092	Bender&Hobein, Bruchsal
Sonifokator	Branson 250	Heinemann, Schw.Gmünd
Ultrazentrifuge	L7-55	Beckmann,München

## 2.2 Oligonukleotide

### 2.2.1 DNA-Sequenzen aus Datenbanken

### 2.2.2 Oligonukleotide

<u>Gen</u>	<u>Richtung</u>	<u>Sequenz</u>
G $\alpha_{i2}$	Sense	5' AGCTATTTGCACTGTCCTG 3'
	Antisense	5' TGTCGGTGGCGCACGTGAA 3'
G $\alpha_{i3}$	Sense	5' TAAACGGTTATGGCGAGAT 3'
	Antisense	5' GAAATCCAAGTGATGTCTT 3'
G $\alpha_{16}$	Sense	5' CACCACGCTAGCCTGGTCATG 3'
	Antisense	5' GCGCCCTTCTTGCTGCCCTCGGG 3'

## 2.3 Materialien für die Molekular- und Zellbiologie

### 2.3.1 Antikörper, Enzyme, Toxine, Radiochemikalien

#### Verwendete primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>mono-/polyklonal</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>
anti-G $\alpha_{i2}$	polyklonal	Kaninchen	Prof. P. Gierschik, Ulm
anti-G $\alpha_{i3}$	polyklonal	Kaninchen	Gramsch, Schwabhausen
anti-G $\alpha_{i6}$	polyklonal	Kaninchen	Prof. P. Gierschik, Ulm
anti-RhoA (26C4)	monoklonal	Maus	Santa Cruz, La Jolla, USA
anti-RhoB(119)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, La Jolla, USA
anti-RhoG (C-20)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, La Jolla, USA
anti-Rac1 (C-11)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, La Jolla, USA
anti-Rac2(C-11)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, La Jolla, USA
Anti-CDC42Hs(P1)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, La Jolla, USA
anti-BrdU-FITC	monoklonal	Maus	Boehringer, Mannheim

#### Verwendete Sekundärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>
anti-Maus-IgG <sub>1</sub> , Peroxidase-konjugiert	Schaf	Amersham, Braunschweig
anti-Kaninchen-IgG <sub>1</sub> , Peroxidase-konjugiert	Esel	Amersham, Braunschweig



### **Verwendete Enzyme**

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Desoxyribonuklease	Pharmacia, Freiburg
Reverse Transkriptase des "Moloney-Maus-Leukämie-Virus"	Pharmacia, Freiburg
T7 DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Trypsin	Gibco, Eggenstein

### **Verwendete Toxine**

<u>Toxin</u>	<u>Hersteller</u>
Pertussistoxin	Prof. K. Aktories, Freiburg
Toxin B aus Clostr. difficile	Prof. K. Aktories, Freiburg
C3-Exotoxin	Prof. K. Aktories, Freiburg

### **Verwendete Radiochemikalien**

<u>Radiochemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
[ <sup>32</sup> P]NAD	NEN, Dreieich
[ <sup>14</sup> C]UDP-Glucose	NEN, Dreieich

## **2.3.2 Reagenzien und Kitsysteme**

### **Verwendete Reagenzien/ Materialien**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Autoradiografiefilme	Amersham, Braunschweig
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
DNS-Molekulargewichtsstandarts	Gibco, Eggenstein
Filterpapier	Schleicher-Schuell, Dassel
Hexamernukleotidlösung	Pharmacia, Freiburg
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Nukleotidmischung	Pharmacia, Freiburg
Protein-Molekulargewichtsstandarts	Pharmacia, Freiburg
Roti®-Block Reagenz	Roth, Karlsruhe

Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Xylene Cyanol	Serva, Heidelberg
Zellophanfolie	Bioplex, Freiburg

### ***Verwendete Kitsysteme***

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Cell Proliferation ELISA System	Amersham, Braunschweig
ECL™ Westernblot-Detektionssystem	Amersham, Braunschweig
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Bad Soden
RNeasy™ Total RNA Kit	Qiagen, Hilden

### **2.3.3 Materialien für die Zellkultur**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
RPMI-1640 Medium	Gibco, Eggenstein
PenicillinG-, Streptomycin-, AmphotericinB-Mix	PAA, Cölbe
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe
PBS	Gibco, Eggenstein
Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe

## **2.4 Zelllinie und Zellkultur**

### **2.4.1 Melanomzelllinie**

<u>Name</u>	<u>Typ</u>	<u>Quelle</u>
Hs294T	Melanomzellen	ATCC, Rockville, USA

### **2.4.2 Kultivierung von Melanomzellen**

Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einer mit Wasserdampf gesättigten, CO<sub>2</sub>-haltigen (5% CO<sub>2</sub>) Atmosphäre bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Die verwendeten Melanomzellen wachsen adhärent und wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert. Dem Medium wurden 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 250 ng/ml Amphotericin B, 2 mM L-Glutamin und 10% FKS zugesetzt (Vollmedium). Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, für 3-8 min mit Trypsin-EDTA Lösung behandelt und anschließend in RPMI-Vollmedium aufgenommen.

### **2.4.3 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zählung mit der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen 1:10 in Türkscher Lösung (Merck, Darmstadt) verdünnt und 10 µl auf den Objektträger der Zählkammer gegeben. Nach Zählung der Zellen wurde unter Berücksichtigung des Volumens der Zählkammer und des Verdünnungsfaktors die Zellzahl in der Ausgangssuspension berechnet.

### **2.4.4 Einfrieren von Zellen**

Zellen bleiben in flüssigem Stickstoff längere Zeit lebensfähig, wenn die Bildung von Eiskristallen verhindert wird. Als Einfriermedium wurde RPMI-1640 Medium mit 40% FKS und 10% DMSO verwendet. Da DMSO giftig für die Zellen ist, muss schnell und auf Eis gearbeitet werden. Die Zellen ( $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  Zellen) wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsinlösung von der Oberfläche abgelöst. Nach Zentrifugation (300g, 10 min) wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und je 500 µl in Kryoröhrchen überführt. In einer Styroporschachtel wurden die Röhrchen in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt und dadurch langsam auf -80 °C abgekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden sie nach 24 Stunden in Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

### **2.4.5 Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen müssen aufgrund der Giftigkeit von DMSO im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut werden. Um das DMSO zu verdünnen, wurden die aufgetauten Zellen sofort in 15 ml Röhrchen mit 10 ml RPMI mit 10% FKS überführt. Durch Zentrifugation (300g, 10 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das DMSO entfernt. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in 10 cm Kulturschalen kultiviert.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 RNA-Isolierung**

Aus den Melanomzellen wurde RNA mit Hilfe des "RNeasy™ Total RNA Kit" (Qiagen, Hilden) und Microspin-Säulen (Qiagen, Hilden) isoliert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Präparation erfolgte entsprechend dem Handbuch des Herstellers mit den im Kit vorhandenen Reagenzien.

Die adhärenenten Kulturzellen ( $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen) wurden mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche abgelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation (300g, 5 min) wurde das Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer (Lysepuffer) aufgenommen, auf die Microspin-Säulen aufgetragen und das Lysat durch Zentrifugation der Säulen (20000g, 2 min) homogenisiert. Der RLT-Puffer enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol und Guanidiniumisothiocyanat, wodurch RNasen und andere Proteine sehr schnell denaturiert und inaktiviert werden. Das Eluat wurde mit einem Volumen 70%igem Ethanol gemischt und auf die RNeasy Säulen aufgetragen. Unter den vorhandenen Bedingungen bindet RNA mit einer Länge von mindestens 200 bp effizient an das Säulenmaterial. Die Säulen wurden einmal mit 700 µl RW1-Puffer (enthält ein Guanidiniumsalz) und anschließend zweimal mit 500 µl RPE-Puffer (enthält ca. 80% Ethanol) gewaschen. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde verlängert, um die Säulen zu trocknen und das Ethanol vollständig zu entfernen (20000g, 2 min). Die RNA wurde zweimal mit 20-40 µl RNase-freiem Wasser von den Säulen eluiert (8000g, 1 min). Die Ausbeute lag bei 60-100 µg Gesamt-RNA ( $1 \times 10^7$  Zellen).

### 2.5.2 Reverse Transkription (RT)

Das Ziel der reversen Transkription ist die Synthese einer zur mRNA komplementären einzelsträngigen DNA. Mit Hilfe der reversen Transkriptase des "Moloney-Maus-Leukämie-Virus" wird ein RNA/DNA-Hybrid erzeugt. Dieses kann direkt für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden. Für die reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA in 11,5 µl Wasser gelöst, 10 min bei 65 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl 100 mM DTT, 1 µl Hexamernukleotidlösung (0,2 µg/µl), 0,5 µl Nukleotidmischung (20 mM/dNTP) und 1 µl der reversen Transkriptase des "Moloney-Maus-Leukämie-Virus" (200 U) wurde die Lösung 1 h bei 37 °C inkubiert. Um die reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde das Gemisch nach Reaktionsende für 5 min auf 90 °C erhitzt. Danach wurde die Lösung auf Eis inkubiert (Sambrook et al. 1989).

*5x RT-Puffer:* 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl, 250 mM Tris, in Aqua bidest. gelöst, auf pH 8,3 eingestellt.

### 2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren zur *in vitro* Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten, wobei nur die flankierenden Sequenzen bekannt sein müssen. Die DNA wird erst durch Hitze denaturiert und dann auf eine Temperatur abgekühlt, die es spezifischen Oligonukleotiden erlaubt, sich an ihre Zielsequenz anzulagern, und einer hitzestabilen DNA-Polymerase als Primer zur Synthese des komplementären Stranges zu dienen. Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA.

Ein Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- x µl DNA-Lösung
- 5 µl 10xPCR Puffer
- 1 µl Nukleotidmischung (20 mM/dNTP)
- 1 µl spezifischer 3'-5'-Primer (10 mol/µl)
- 1 µl spezifischer 5'-3'-Primer (10 mol/µl)
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)

- ad 50 µl Aqua bidest.

Um Verdunstung und Kontamination der Probe während der Amplifikation zu verhindern, wurde die Lösung mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Ein Standardprotokoll für ein 200-1500 bp großes DNA-Segment besteht aus 30 Zyklen von jeweils 20 sec Denaturierung bei 94 °C, 40 sec für die Anlagerung der Primer bei 50-63 °C und 60 sec Synthese bei 72 °C. Alle PCR Reaktionen wurden im Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

*Pharmacia 10x PCR Puffer:* 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris, in Aqua bidest. gelöst, auf pH 9,0 eingestellt.

## **2.6 Elektrophoretische Methoden**

### **2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in der "Submarine-Kammer". Hierfür wurden 240 mg Agarose (0,8%) in 30 ml TBE-Puffer aufgenommen und in einem Mikrowellenofen erhitzt. Nach dem Abkühlen unter 60 °C wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in den Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120V. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht (254 nm) detektiert und fotografiert (Geldokumentationssystem I, MWG Biotech).

*TBE-Puffer:* Tris 900mM, Borsäure 900mM, EDTA 20mM, in Aqua bidest. gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt

*5x DNA-Probenpuffer:* 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol, 15% Ficoll in Aqua bidest. gelöst

### **2.6.2 Westernblot**

Für den Western-Blot wurde Protein aus Melanomzellen isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf ein festes Trägermaterial wie Nitrozellulose-Membranen transferiert. Dort erfolgte die spezifische Detektion von bestimmten Proteinspezies mittels immunologischer Methoden.

### **2.6.2.1 Proteinisolierung, Proteinbestimmung**

Für die Proteinisolierung wurde auf die adhärenenten Melanomzellen 500 µl Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren (1/100 Volumen) gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach Beschallung (Branson 250 Sonifier, 5 Pulse, Duty Cycle 10%, Output Control 1) auf Eis, wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (20000g, 30 min, 4 °C) entfernt. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Alle Schritte wurden unter ständiger Kühlung durchgeführt.

*Lysepuffer:* 1% Nonidet P-40, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 0,1% SDS, 250 mM Tris, pH 8,0.

*Proteaseinhibitoren:* 100 mM AEBSF/HCl, 80 µM Aprotinin, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupeptin, 1 mM Pepstatin A (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, Bad Soden).

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt. Diese beruht auf der Wechselwirkung des Proteins mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Zur Durchführung werden 10 µl Probe und 200 µl Coomassie Blue G250 Reagenz gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Konzentration der Probe wird mit einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin ermittelt.

### **2.6.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**

Zur Charakterisierung von Proteinen wurden diese nach ihrem Molekulargewicht durch SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Gele bestehen aus einem Trenngel (10-15% Acrylamid) und einem Sammelgel (5% Acrylamid). Das Trenngel wurde gegossen und mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet. Nach Ende der Polymerisation (30 min) wurde das Butanol entfernt, das Sammelgel gegossen und die Gelkämme eingesteckt. Die fertigen Gele wurden frühestens 2 h nach Ende der Polymerisation verwendet. Die Proben (50 µg) wurden in 1 Volumen 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 3 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Elektrophoresepuffer bei 180 V für ca. 1,5 h in der

Elektrophoresekammer (Mini Protean II, BioRad, München). Der Probenpuffer enthielt einen Phosphatpuffer. Dies führt zu einer Reduktion der sauren Hydrolyse von Proteinen, da sich der  $pK_a$  des Phosphatpuffers mit steigender Temperatur kaum verändert (Cannon-Carlson und Tang 1997).

*2x SDS-Probenpuffer:* 10% Glyzerin, 4%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 125 mM Tris, in Aqua bidest.gelöst, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

*10x Elektrophoresepuffer:* 30,28 g/l Tris, 144 g/l Glycin, 10g SDS mit Aqua bidest. auf 1l aufgefüllt.

*Leichte Lösung:* 29,1% Acrylamid, 0,9% Bisacrylamid mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

*Schwere Lösung:* 29,1% Acrylamid, 0,9% Bisacrylamid, 60% Glyzerin mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

*SDS-Gelpuffer:* 0,4% SDS, 1,5M Tris, gelöst in Aqua bidest, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt.

*SDS-Trenngel (4 Gele):* 10 ml schwere Lösung, 1ml Glyzerin, 7,5 ml SDS-Gelpuffer, mit Aqua bidest auf 30 ml aufgefüllt; zum Start der Polymerisation 65  $\mu$ l TEMED, 132  $\mu$ l 40% Ammoniumpersulfat.

*Sammelgel (4 Gele):* 1,6 ml leichte Lösung, 2,5 ml SDS-Gelpuffer, mit Aqua bidest auf 10 ml aufgefüllt; zum Start der Polymerisation 20  $\mu$ l TEMED, 35  $\mu$ l 40% Ammoniumpersulfat.



### 2.6.2.3 Elektroblotting

Für den Elektrottransfer wurde ein Naßtankverfahren benutzt (Mini Trans Blot, BioRad, München). Hierfür wurden Filterpapiere, Nitrozellulosemembran und Gel vor dem Transfer 30 min in Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer für eine Stunde bei konstant 100 V und 4 °C. Nach dem Transfer wurde das Gel mit Coomassie-Lösung und die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen. Auf der Membran wurde der Molekulargewichtsstandard markiert, abgeschnitten und falls nötig, die Membran in mehrere Teile zerschnitten. Anschließend wurde die Membran in Wasser entfärbt.

*Coomassie-Lösung:* 40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie Brilliant Blue G250.

*Ponceau S-Lösung:* 0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure.

*Blotpuffer:* 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, gelöst in Aqua bidest.

### 2.6.2.4 Detektion

Freie Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation RotiBlock (Roth, Karlsruhe) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Alle Antikörper wurden in Waschpuffer mit 2% BSA und 0,001% Thimerosal verdünnt. Primäre monoklonale Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,2-1 µg/ml verwendet, polyklonale Antikörper in einer Konzentration von 0,05-0,1 µg/ml. Sekundäre Antikörper wurden stärker verdünnt (0,005-0,1 µg/ml). Der primäre Antikörper wurde unter leichtem Schütteln für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem kurzem Waschen wurde noch zweimal 15 min mit Waschpuffer inkubiert, um überschüssigen oder unspezifisch gebundenen Antikörper möglichst vollständig zu entfernen. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte für eine Stunde unter leichtem Schütteln mit einem sekundären Antikörper. An alle sekundären Antikörper ist Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Membran wurde in gleicher Weise gewaschen wie oben. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte über ein Chemilumineszenzverfahren (ECL<sup>TM</sup>-Western Blotting Detektionssystem, Amersham, Braunschweig). Dazu wurde die Detektionslösung aus gleichen Teilen der ECL-Lösungen A und B angesetzt

und für 1 min mit der Membran inkubiert. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase entsteht ein oxidiertes Produkt, welches über einen längeren Zeitraum hinweg Licht emittiert. Die Membran wurde in Zellophanfolie eingewickelt und im Dunkeln auf einen Autoradiografiefilm aufgelegt. Die Belichtungszeiten lagen gewöhnlich zwischen wenigen Minuten bis zu zwei Stunden.

*Waschpuffer:* 0,5% Tween-20 in PBS.

*ECL-Lösungen A & B:* enthalten Peracid und Luminol; die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

*Roti®-Block:* 10x Blockierungsreagenz auf Polymerbasis (Roth, Karlsruhe).

## **2.7 Zellbiologische Methoden**

### **2.7.1 ADP-Ribosylierung und Monoglucosylierung**

Vorinkubation:

Die Melanomzellen wurden auf 10 cm Schalen plattiert und 24 h kultiviert. Anschließend wurde a) 1 µg/ml Pertussistoxin bzw. b) 75 oder 150 ng/ml Clostridium difficile Toxin B zugegeben und für verschiedene Zeiten mit den Zellen inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden 200 µl Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren (10 µl/ml, Calbiochem, Bad Soden) zu den Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgeschabt. Das Zelllysate wurde fünfmal kurz auf Eis beschallt (Branson Sonifier 250: Output Control 1, Duty Cycle 10%) und anschließend 30 min zentrifugiert (4 °C, 20000g), der Überstand wurde abgenommen.

#### **a) Nachweis der ADP-Ribosylierung von G $\alpha_i$ -Proteinen**

Hierfür wurde eine zweite ADP-Ribosylierung mit Pertussistoxin in Gegenwart von [ $^{32}$ P]NAD durchgeführt.

#### **b) Nachweis der Monoglucosylierung von Rho-Proteinen**

Es wurde nach der Inkubation mit Toxin B eine zweite Monoglucosylierung mit Toxin B bzw. dem katalytisch aktivem Fragment CDB1-546 in Gegenwart von UDP-[ $^{14}$ C]Glucose bzw. eine ADP-Ribosylierung mit C3-Exoenzym in Gegenwart von [ $^{32}$ P]NAD durchgeführt.

### ADP-Ribosylierung

Ein Standardansatz enthielt:

- 200 µg Protein
- 5 µl Ribosylierungspuffer
- 5 µl [<sup>32</sup>P]NAD (10 µM, 10 µCi)
- 5 µl Pertussistoxin (25 ng/µl) bzw. 5 µl C3-Exotoxin (100 ng/µl)

und wurde anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert.

### Monoglucosylierung

Ein Standardansatz enthielt:

- 150 µg Protein
- 2 µl Glucosylierungspuffer
- 1 µl [<sup>14</sup>C]UDP-Glucose (200 µM, 50 nCi)
- 2 µl CDB1-546 (100 ng/µl)

und wurde mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Beide Reaktionen wurden durch Zugabe von einem Volumen SDS-Probenpuffer gestoppt und auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.6.2.2). Das Gel wurde getrocknet und autoradiografisch mit einem "Phosphorimager SF" (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA/USA) ausgewertet.

*Lysepuffer:* 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,5.

*Ribosylierungspuffer:* 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 µM NAD, 250 mM Triethanolamin/HCl, pH 7,5.

*Glucosylierungspuffer:* 1 M KCl, 1 mg/ml BSA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 M Hepes, pH 7,5.

## **2.7.2 Proliferationstests**

### **2.7.2.1 MTT-Test**

Dieser Test wird als Proliferationstest eingesetzt. Der Test hängt von der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen ab. Das in den Test eingesetzte Substrat MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) wird von metabolisch aktiven, lebensfähigen Zellen durch Dehydrogenasen zu einem blauen, wasserlöslichen Formazan umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bei 540 nm bestimmt wird. Der Test wurde in 96-Loch Platten mit 5000 Zellen pro Loch durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FKS für 8 h bei 37°C inkubiert, daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium mit 0,5% FKS für weitere 12 h inkubiert. Anschließend wurde ein Inhibitor (Toxin) zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und im gleichen Medium mit 50 µl MTT-Lösung (2µg/µl in PBS) und 150µl Medium für weitere 4 h kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen in 150 µl Dimethylsulfoxid resuspendiert. Die Menge des gebildeten Formazans wurde bei 540 nm im Photometer bestimmt.

### **2.7.2.2 Einbau von Bromodesoxyuridin in die DNA**

Dieser Test wird wie der MTT-Test als Proliferationstest eingesetzt. In den allermeisten Fällen liefert er übereinstimmende Ergebnisse. Als Maß für die Charakterisierung der Proliferationsrate von Kulturzellen dient die Rate der DNA-Synthese. Traditionell wurde dafür der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA eingesetzt. Neuere Methoden bedienen sich des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU). Alle Zellen, die sich innerhalb des Inkubationszeitraums in der S-Phase des Zellzyklus befinden, bauen BrdU in die DNA ein. Bei stark proliferierenden Zellpopulationen ist der Anteil dieser Zellen erhöht. Der Test wurde in 96-Loch Platten mit 5000 Zellen pro Loch durchgeführt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FKS für 8 h bei 37°C inkubiert, daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium mit 0,5% FKS für weitere 12 h inkubiert. Anschließend wurde ein Inhibitor (Toxin) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Zellen für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 4 h mit 100 µM BrdU

und danach wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen untersucht, die Auswertung des Tests wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **2.8 *Verwendete Software und statistische Verfahren***

Die Verwaltung von DNA-Sequenzen aus Datenbanken und Sequenzierungen, das Design von Primern und Sonden, sowie Sequenzvergleiche erfolgte mit dem "Lasergene" Softwarepaket (DNA-Star, London). Gele, Filme und Autoradiogramme wurden mit Corel PhotoPaint V8.0 eingescannt, bearbeitet und konvertiert. Die Beschriftungen und Symbole wurden mit Microsoft Word eingefügt. Die Daten der ADP-Ribosylierung, Monoglucosylierung und Proliferationstests wurden mit Microsoft Excel97 verwaltet und mit GraphPad Prism V2.0 graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung dieser Daten erfolgte ebenfalls mit GraphPad Prism V2.0.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Heterotrimere G-Proteine

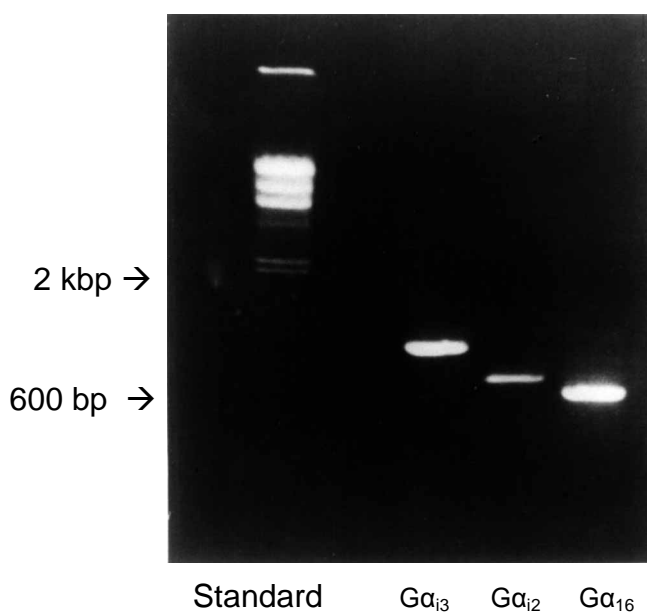
#### 3.1.1 G-Protein-Subtypen

Um zu überprüfen, welche G-Protein-Subtypen in Melanomzellen exprimiert sind, wurde mit RT-PCR die mRNA-Expression und mit verschiedenen spezifischen Antikörper die Protein-Expression von  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  und  $G\alpha_{16}$  untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in Hs294T-Melanomzellen sowohl die mRNA als auch das Protein von  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$  und  $G\alpha_{16}$  exprimiert werden.

Zunächst wurde mRNA aus Melanomzellen isoliert, mit Hilfe von reverser Transkriptase und PCR wurden DNA-Fragmente hergestellt und diese auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die erwarteten DNA-Fragmente sollten eine Länge von 932 bp ( $G\alpha_{i3}$ ), 671 bp ( $G\alpha_{i2}$ ) und 612 bp ( $G\alpha_{16}$ ) haben. Wie Abb. 5 zeigt, konnten Produkte mit dieser Größe in Hs294T-Melanomzellen nachgewiesen werden.

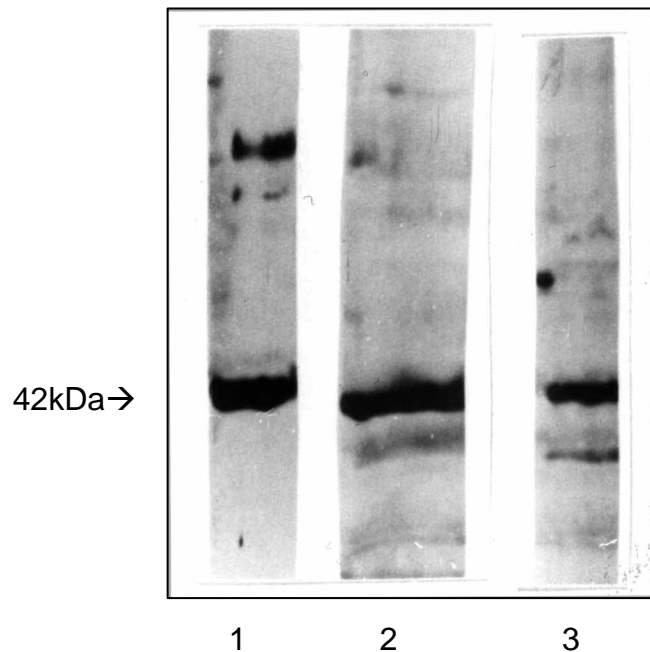
Durch Sequenzierung wurde die Identität der hergestellten PCR-Produkte bestätigt.



**Abbildung 5: DNA-Agarosegelelektrophorese der  $G\alpha_{i3}$ -,  $G\alpha_{i2}$ -,  $G\alpha_{16}$ -PCR-Produkte aus Melanomzellen**

Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht (254 nm) detektiert und fotografiert.

In einem weiteren Experiment wurden Proteine der Melanozytenmembran isoliert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch ElektrobloTTing auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die entsprechenden Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern und anschließende Detektion mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und dem ECL™-Detektionskit sichtbar gemacht werden. Es wurde jeweils eine Bande in der Größe von ca. 42 kDa gefunden.



**Abbildung 6: Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die G-Protein Subtypen  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ , und  $G\alpha_{i16}$ .**

Die Proteine der Zellmembran von Melanomzellen wurden isoliert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. G-Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert: Spur (1) anti- $G\alpha_{i2}$ , (2) anti- $G\alpha_{i3}$ , und (3) anti- $G\alpha_{i16}$ .

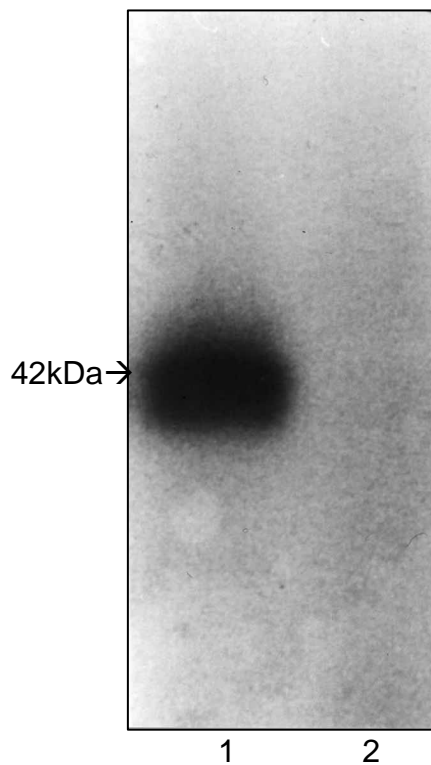
### 3.1.2 Nachweis der Pertussistoxinwirkung in Melanomzellen

Pertussistoxin ist eine ADP-Ribosyltransferase, die die  $\alpha$ -Untereinheit der  $G\alpha_i$ -Subtypen an einem Cysteinrest ADP-ribosyliert (Gierschik, 1992). Die Melanomzellen wurden hierfür ohne und mit Pertussistoxin für 12 h inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und eine zweite ADP-Ribosylierung durch Pertussistoxin in Gegenwart von [ $^{32}$ P]NAD durchgeführt.

Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Autoradiografie analysiert. Das Autoradiogramm

- Ergebnisse -

unbehandelter Zellen zeigt eine Bande mit einem Molekulargewicht von 42 kDa (Abb. 7). Im Lysat der Pertussistoxin-vorbehandelten Melanomzellen wurde keine radioaktive Markierung gefunden. Auf Grund des geringeren bzw. fehlenden Einbaus von [ $^{32}$ P]ADP-Ribose im Lysat vorinkubierter Melanomzellen wurde indirekt bewiesen, dass bei diesen Melanomzellen das  $G\alpha_i$ -Protein bereits während der Vorbehandlung mit Pertussistoxin ADP-ribosyliert wurde.



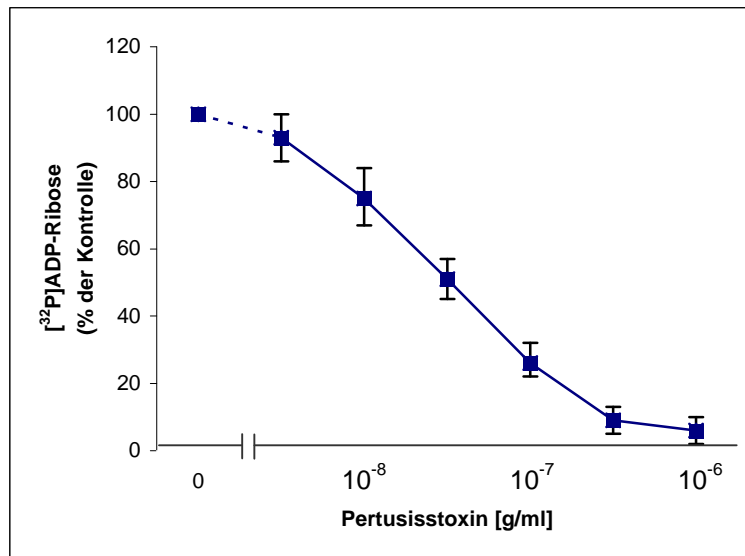
**Abbildung 7: Autoradiogramm des Melanomzellenlysats nach ADP-Ribosylierung durch Pertussistoxin.**

Melanomzellen wurden ohne (1) und mit 1  $\mu$ g/ml Pertussistoxin (2) für 12 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine zweite ADP-Ribosylierung mit Pertussistoxin in Gegenwart von [ $^{32}$ P]NAD durchgeführt. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Autoradiografie analysiert. (Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von mehreren Versuchen mit identischem Ergebnis).

Das Ergebnis der Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit der verminderten ADP-Ribosylierung ist in Abb. 8 graphisch dargestellt. Die maximale Hemmung des Einbaus von [ $^{32}$ P]ADP-Ribose in die  $G\alpha_i$ -Proteine



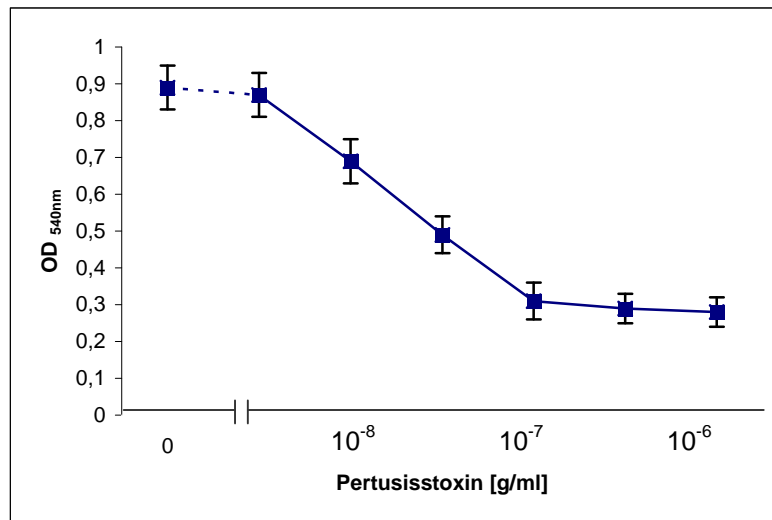
wurde bei einer Pertussistoxinkonzentration von  $1\mu\text{g/ml}$  ( $=10^{-6}\text{ g/ml}$ ) während der Vorbehandlung erreicht.



**Abbildung 8: Quantifizierung des Einbaus von Radioaktivität in Melanomzelllysate nach ADP-Ribosylierung durch Pertussistoxin verschiedener Konzentrationen**

Melanomzellen wurden für 12 h mit den angegebenen Konzentrationen an Pertussistoxin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine zweite ADP-Ribosylierung mit Pertussistoxin in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]NAD durchgeführt. Der Einbau der Radioaktivität wurde quantifiziert. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4). Das Signal bei unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Um zu untersuchen, ob bei dem autokrinen Wachstum von Melanomzellen Pertussistoxin-sensitive G-Proteine beteiligt sind, wurde der Einfluß von Pertussistoxin mit dem MTT-Test untersucht. In Abb. 9 wurde gezeigt, daß Pertussistoxin die Proliferation konzentrationsabhängig hemmt. Bei diesen Experimenten konnte eine enge Korrelation der Modifizierung der G-Proteine und der Proliferation festgestellt werden.



**Abbildung 9: Einfluß von Pertussistoxin auf die Proliferation von Melanomzellen**

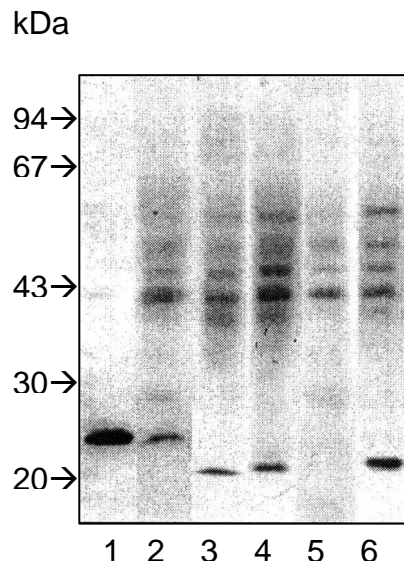
Der Einfluß von Pertussistoxin auf die Proliferation wurde photometrisch mit dem MTT-Test gemessen. Melanomzellen wurden für 12 h mit den angegebenen Konzentrationen an Pertussistoxin inkubiert. (OD=optische Dichte). Die Daten sind Mittelwerte + SEM (n = 4).

## 3.2 Monomere G-Proteine

### 3.2.1 Expression von Rho-Proteinen in Melanomzellen

In diesem Experiment wurde im Westernblot untersucht, welche Rho-Proteine in Hs294T-Melanomzellen exprimiert werden. Der Nachweis der Rho-Proteine erfolgte mit verschiedenen spezifischen Antikörpern. In Abb. 10 ist ein repräsentativer Western-Blot dargestellt. Die Membran wurde für die Detektion mit den verschiedenen Antikörpern in einzelne Streifen zerschnitten und für die Belichtung des Filmes wieder zusammengesetzt. Die Stärke der Expression kann nicht direkt verglichen werden, da es sich bei dem Antikörper gegen RhoA um einen monoklonalen Maus-Antikörper handelte, während alle anderen polyklonale Kaninchen-Antikörper waren. Daher wurde auch ein unterschiedlicher Sekundärantikörper verwendet. Eindeutig detektiert wurden RhoA, RhoB, RhoG, Rac1 und Cdc42. Das Rho-Protein Rac2 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Letzteres entsprach auch der Erwartung, da Rac2 bisher nur in Zellen der hämatopoetischen Linie nachgewiesen wurde (Dorseuil et al. 1996; Roberts et al. 1999). Die Signale im Bereich von 35 bis 67 kDa in

den Spuren 2 bis 6, entstanden aufgrund unspezifischer Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers. Die Inkubation der Proben mit dem verwendeten anti-Kaninchen Antikörper alleine führte zum gleichen Bandenmuster. Die Signale um 21 kDa traten dagegen nur bei zusätzlicher Verwendung der primären Antikörper gegen die verschiedenen Rho-Proteine auf.



**Abbildung 10: Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Rho-Proteine RhoA, RhoB, RhoG, Rac1, Rac2 und Cdc42**

Die Proteine der Melanomzellmembranen wurden isoliert, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Rho-Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert: Spur (1) anti-RhoA, (2) anti-RhoB, (3) anti-RhoG, (4) anti-Rac1, (5) anti-Rac2 und (6) anti-Cdc42.

### 3.2.2 Nachweis der Clostridium difficile Toxin B Wirkung in Melanomzellen

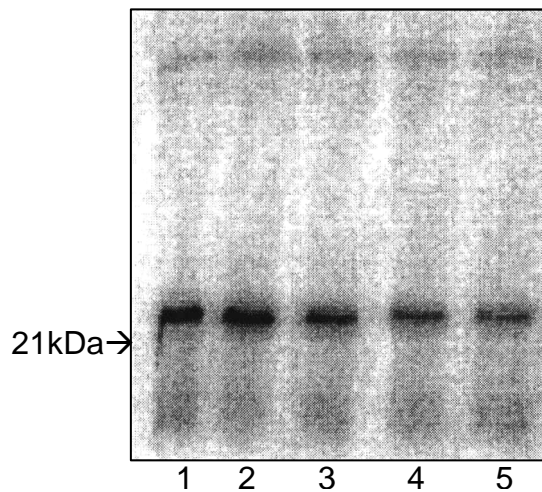
Toxin B aus Clostridium difficile ist eine Monoglucosyltransferase, die Rho-Proteine durch Monoglucosylierung modifiziert, wobei UDP-Glucose als Cofaktor dient (Just et al. 1995a). Die Melanomzellen wurden hierfür mit 75ng/ml bzw. 150ng/ml Toxin B unterschiedlich lange inkubiert (0,5, 1, 2 oder 4 h). Danach wurden die Zellen lysiert und eine ADP-Ribosylierung durch Exotoxin-C3 (Clostridium botulinum) in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]NAD durchgeführt. In einem weiteren Experiment wurden die Melanomzellen ebenfalls mit 75ng/ml

bzw. 150ng/ml Toxin B unterschiedlich lange inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer zweiten Monoglucosylierung durch Toxin B (*Clostridium difficile*) in Gegenwart von UDP-[<sup>14</sup>C]Glucose unterzogen.

Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Autoradiografie analysiert. Das Autoradiogramm unbehandelter Zellen zeigt jeweils deutliche Banden mit einem Molekulargewicht um 21 kDa, mit zunehmender Dauer der Vorbehandlung mit Toxin B wurde diese Bande schwächer (Abb. 11 und Abb. 13). Demnach ist der Einbau an Radioaktivität umso geringer, je stärker modifiziert die Rho-Proteine durch die Vorbehandlung schon waren.

Mit diesen Daten konnte somit gezeigt werden, dass *Clostridium difficile* Toxin B in die Melanomzellen eindringen und Rho-Proteine modifizieren kann.

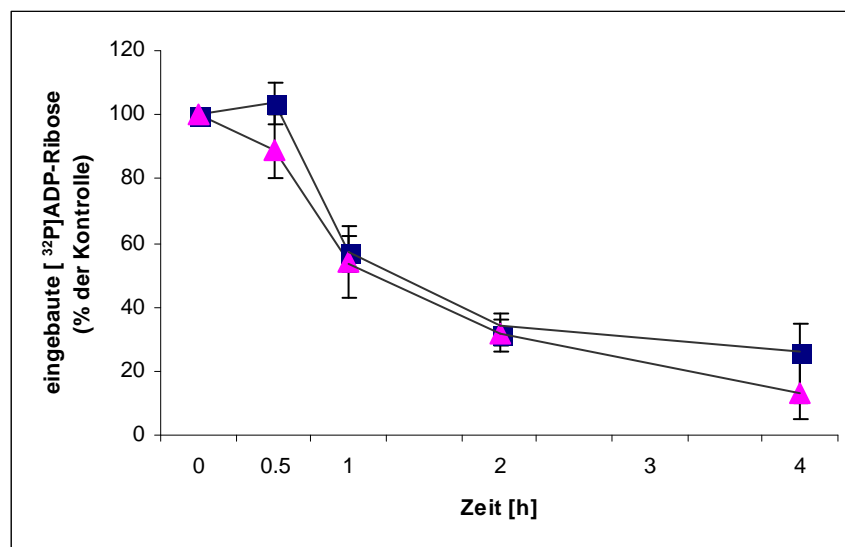
Das Autoradiogramm in Abb. 11 zeigt beispielhaft eine ADP-Ribosylierung mit dem Exoenzym-C3 aus *C. botulinum*. Das Exoenzym-C3 modifiziert nur RhoA, RhoB und RhoC durch ADP-Ribosylierung. Alle anderen Rho-Proteine werden nicht modifiziert. (Aktories et al. 1992; Mohr et al. 1992; Sehr et al. 1998). Die hoch homologen Proteine RhoA, RhoB und RhoC können auf diesen Gelen nicht voneinander getrennt werden. In den Spuren 1-5 in Abb. 11 war daher nur ein Signal im Bereich um 21 kDa zu erkennen. Aufgrund der Größe und der Modifizierung durch das Exoenzym-C3, kann das Signal von einem oder auch von allen drei Rho-Proteinen RhoA, RhoB oder RhoC stammen. Die Intensität des detektierten Signals nahm abhängig von der Dauer der Vorinkubation mit Toxin B ab.



**Abbildung 11: Autoradiogramm des Melanomzelllysats nach ADP-Ribosylierung durch Exotoxin-C3 aus Toxin B-vorbehandelten Melanomzellen**

Melanomzellen wurden ohne (Spur 1) und mit 75 ng/ml Toxin B für 0,5 h (Spur 2), 1 h (Spur 3), 2 h (Spur 4) und 4 h (Spur 5) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und einer ADP-Ribosylierung durch Exotoxin-C3 in Anwesenheit von [ $^{32}$ P]NAD unterworfen. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Autoradiografie analysiert. (Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von drei Versuchen mit identischem Ergebnis).

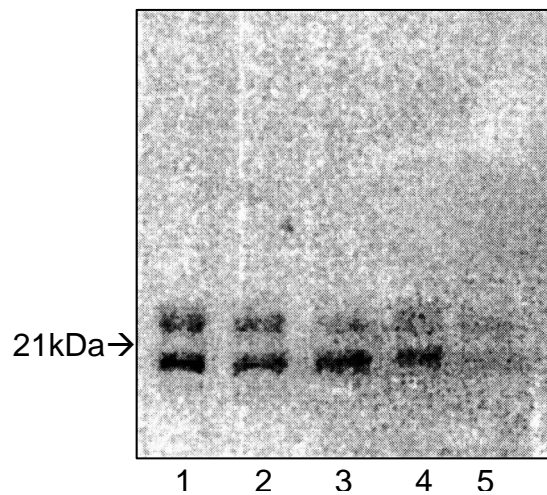
Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 12 graphisch dargestellt. Das Signal bei unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Der Einbau von [ $^{32}$ P]ADP-Ribose in die Rho-Proteine fiel bei beiden Toxin B-Konzentrationen nach knapp 1,5 h auf 45% ab. Die maximale Hemmung des Einbaus von [ $^{32}$ P]ADP-Ribose in die Rho-Proteine wurde am Ende der Inkubationsdauer erreicht.



**Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Autoradiogramme**

Melanomzellen wurden mit 75 ng/ml (■) oder 150 ng/ml (▲) Toxin B für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3). Das Signal bei unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Die Monoglucosylierung mit Toxin B bzw. dem katalytisch aktiven Toxin B-Fragment CDB1-546 (Hofmann et al. 1997) ist in Abb. 13 dargestellt. Toxin B aus *Clostridium difficile* ist eine Monoglucosyltransferase mit Substratspezifität für alle Rho-Proteine (Just et al. 1994; Just et al. 1995a; Just et al. 1995b). Es modifiziert, im Gegensatz zum Exoenzym-C3, neben RhoA, RhoB und RhoC auch alle anderen Rho-Proteine. Da RhoA, RhoB und RhoC von den restlichen Rho-Proteinen separiert werden können, sind in Abb. 13 zwei Signale im Bereich um 21 kDa zu erkennen. Das obere der beiden Signale entspricht in der Größe dem Signal in Abb. 11 und enthält eines oder alle drei Rho-Proteine RhoA, RhoB und RhoC. Da die ADP-Ribosylierung schon eine Aussage über die Modifizierung dieser Proteine ergab, wurde bei der Monoglucosylierung nur jeweils das untere der beiden Signale in Abb. 13 ausgewertet. Aufgrund der geringeren Größe und der Modifizierung durch Toxin B, aber nicht durch das Exoenzym-C3, handelt es sich dabei um eines oder mehrere der Rho-Proteine RhoG, Rac1, Cdc42 und TC10. Die Intensität aller Signale nahm abhängig von der Dauer der Vorinkubation mit Toxin B ab.

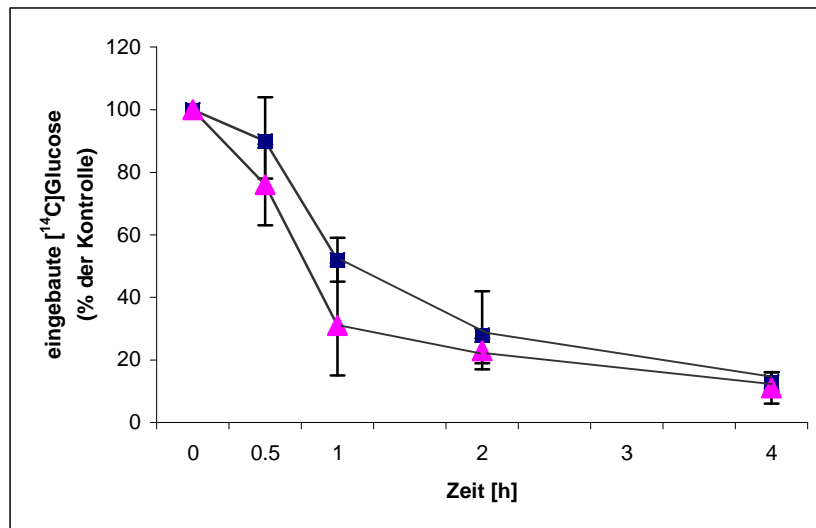


**Abbildung 13: Autoradiogramm des Melanomzelllysats der Monoglucosylierung durch *Clostridium difficile* Toxin B.**

Melanomzellen wurden ohne (Spur 1) und mit 75 ng/ml Toxin B für 0,5 h (Spur 2), 1 h (Spur 3), 2 h (Spur 4) und 4 h (Spur 5) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und eine zweite Monoglucosylierung mit Toxin B in Gegenwart von [ $^{14}\text{C}$ ]UDP-Glucose durchgeführt.

Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiografie analysiert. (Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von drei Versuchen mit identischem Ergebnis).

Bei der quantitativen Auswertung der Monoglucosylierung wurde das Signal von unbehandelten Zellen wiederum auf 100% gesetzt. Die Daten dieser Auswertung sind in [Abb. 14](#) grafisch dargestellt. Der Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]Glucose in die Rho-Proteine wurde durch eine circa einstündige Inkubation mit Toxin B halbmaximal gehemmt. Die maximale Hemmung lag bei 4 h Inkubation Toxin B. Diese Ergebnisse belegen eine Modifikation der Rho-Proteine durch Toxin B während der Vorbehandlung an Melanomzellen.



**Abbildung 14: Quantitative Auswertung der Autoradiogramme**

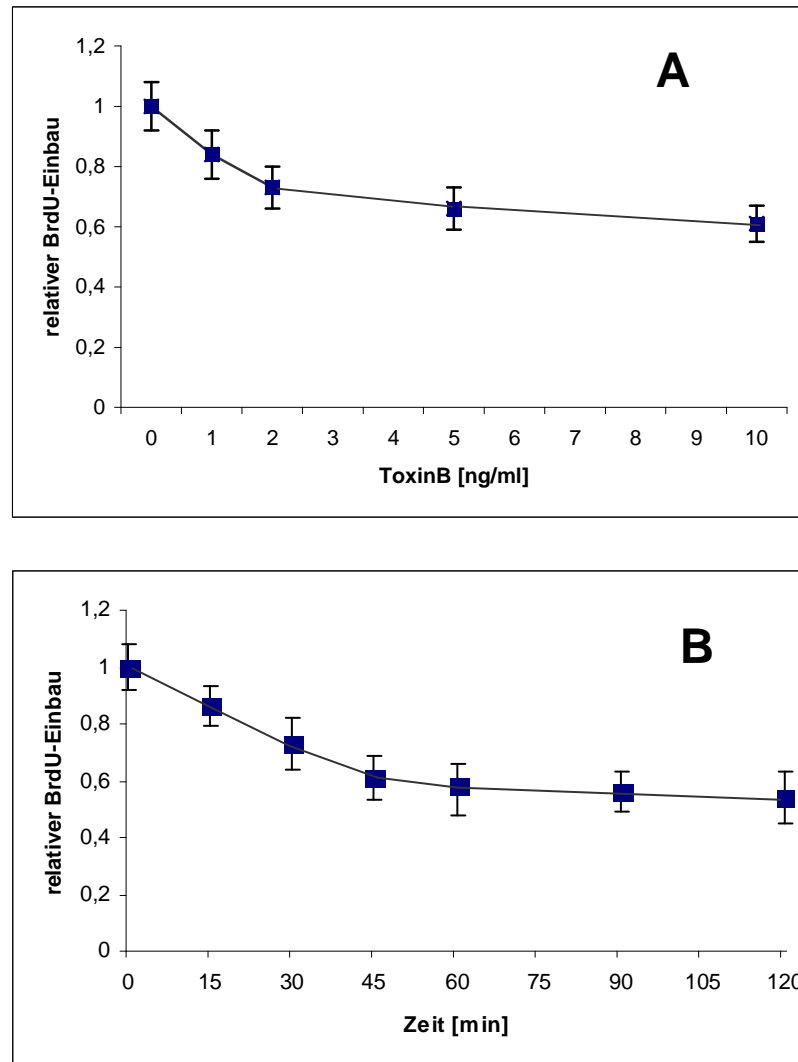
Melanomzellen wurden mit 75 ng/ml (■) oder 150 ng/ml (▲) Toxin B für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3). Das Signal bei unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Von Toxin B wurde beschrieben, dass es durch Inaktivierung aller Rho-Proteine auch zur Hemmung der Proliferation von Zellen bzw. zu einer erhöhten Apoptose kommt (Fiorentini et al. 1998). Dieser Effekt von Toxin B wurde bei Hs294T-Melanomzellen ebenfalls überprüft. Dafür wurde eine definierte Zellzahl plattiert, kultiviert und mit unterschiedlichen Toxin B Konzentrationen für 12 h inkubiert. Um die Zeitabhängigkeit zu überprüfen, wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit 20 ng/ml Toxin B inkubiert. Nach weiteren 4 h Inkubation mit 100  $\mu$ M Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde der Einbau von BrdU in die DNA der Zellen gemessen.

In Abb. 15 sind die Daten für die Hemmung der Proliferation von Melanomzellen zusammengestellt. Die Proliferation wurde schon durch Konzentrationen ab 2 ng/ml Toxin B signifikant gehemmt. Die maximale Hemmung nach 12 h Vorinkubation mit Toxin B lag um 45% und wurde mit 10 ng/ml Toxin B beobachtet (Abb. 15A). Die Inkubation der Zellen mit 20 ng/ml Toxin B für nur 30 bis 45 min bewirkte eine halbmaximale Hemmung der Proliferation von Hs294T (Abb. 15B). Die maximale Hemmung wurde nach 90 bis 120 min erreicht und lag um 55%. Aufgrund der ADP-Ribosylierungs- und der Glucosylierungsversuche kann abgeschätzt werden, dass nach 30 bis 45 min



maximal 25% der Rho-Proteine modifiziert und inaktiviert waren. Nach 90 bis 120 min dürften dagegen 60 bis 75% der Rho-Proteine inaktiviert gewesen sein.



**Abbildung 15 A/B: Konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Proliferation von Hs294T-Melanomzellen durch *Clostridium difficile* Toxin B.**

Die Zellen wurden (A) mit verschiedenen Toxin B-Konzentrationen für 12 h oder (B) mit 20 ng/ml Toxin B für verschiedene Zeiten vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 4 h mit 100  $\mu$ M BrdU und danach wurde der Einbau von BrdU in die DNA der Zellen untersucht. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=4).

## 4 Diskussion

Heterotrimere G-Proteine spielen unter anderem eine Rolle bei der Signaltransduktion des Interleukin-8-Rezeptors. Zytokine, welche an diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit hoher Affinität binden, sind das Gro $\alpha$  (growth regulated oncogene  $\alpha$ ) und das Interleukin-8 (Schraufst tter et al. 1993; Damaj et al. 1996). Gro $\alpha$  und Interleukin-8 sind autokrine Wachstumsfaktoren für Melanomzellen (Schadendorf et al. 1993; Luan et al. 1997). Weiterhin gibt es Hinweise, dass auch G-Protein vermittelte Signaltransduktionskaskaden anderer Rezeptoren an der Regulation der Zellfunktionen wie Migration, Adhärenz, Phagozytose und Sauerstoffradikalproduktion beteiligt sind. Es konnten Hinweise gewonnen werden, dass heterotrimere G-Proteine an der Aktivierung von Rho-Proteinen beteiligt sind (Norgauer et al. 1988; Norgauer et al. 1989, Buhl et al. 1995).

Da bisher noch nicht festgestellt wurde, welche G-Protein-Subtypen in Melanomzellen exprimiert werden, wurde dies in der vorliegenden Arbeit auf RNA- und auf Proteinebene untersucht. Dadurch konnte durch RNA-Isolierung, Reverse Transkription, PCR und anschließende DNA-Elektrophorese sowie ebenso durch Proteinisolierung und -detektion mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot die Pertussistoxin-sensitiven G-Protein-Subtypen G $\alpha_{i2}$  und G $\alpha_{i3}$  und das Pertussistoxin-insensitive G-Protein G $\alpha_{16}$  in Melanomzellen nachgewiesen werden.

Das Pertussistoxin aus *Bordetella pertussis* blockiert G $\alpha_i$ -Proteine durch ADP-Ribosylierung. Durch den Einsatz dieses Toxins wurde in dieser Arbeit die Rolle von G-Proteinen bei der Proliferation der Melanomzellen untersucht. Die konzentrationsabhängige Modifizierung der G $\alpha_i$ -Proteine in Hs294T-Melanomzellen durch Pertussistoxin wurde in ADP-Ribosylierungsversuchen nachgewiesen. ADP ribosylierte in Melanomzellen die G $\alpha_i$ -Proteine. Damit wurde die Proliferation der Zellen unterdrückt. Aufgrund dieser Befunde kann man davon ausgehen, dass in Melanomzellen, die G $\alpha_i$ -Protein-Subtypen durch Pertussistoxin ADP-ribolysiert werden und dadurch die Fähigkeit zur Zellproliferation abnimmt.

Die kleinen, monomeren G-Proteine können durch Wechselwirkungen mit heterotrimeren G-Proteinen aktiviert werden (Buhl et al. 1995). Die Stimulation mit Thrombin führt zur Aktivierung eines G-Proteins mit G $\alpha_{13}$ -Untereinheit. Der

für Rho spezifische Austauschfaktor p115RhoGEF besitzt eine RGS-Sequenz ("regulator of G-Protein signaling domain"), über die er die intrinsische GTPase von  $G\alpha_{13}$  stimulieren kann. Aktiviertes  $G\alpha_{13}$  stimuliert seinerseits die Fähigkeit von p115RhoGEF den Nukleotidaustausch an Rho zu katalysieren (Hart et al. 1998; Kozasa et al. 1998). Durch diese Wechselwirkungen kommt es einerseits zur Inaktivierung von  $G\alpha_{13}$  und andererseits zur Aktivierung von Rho. Die Aktivierung bestimmter Austauschfaktoren durch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine soll zur Aktivierung von Rac führen (Kiyono et al. 1999; Seasholtz et al. 1999; Sun et al. 1999). Eine Aktivierung von Rho-Proteinen scheint aber auch durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie möglich zu sein (Kjoller & Hall 1999).

Rho-Proteine spielen eine Rolle bei der Proliferation, der Modifikation des Aktinzytoskeletts, der Zytokinese, der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und beim Vesikeltransport. Aufgrund der Regulation von Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden durch Rho-Proteine, beeinflussen sie auch die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren und die Expression vieler Gene. Durch die gegenseitige Beeinflussung von Signalwegen, die durch Ras- und Rho-Proteine reguliert werden, spielen sie häufig auch eine Rolle bei der Entstehung und der Metastasierung von Tumoren.

Die Art und Weise, wie Rho-Proteine dabei mitwirken, ist noch weitgehend unbekannt. Bekannte und wichtige Faktoren für die Entstehung von Tumoren und die anschließende Metastasierung sind z.B. eine unkontrollierte Proliferation, das Eindringen in umgebende Gewebe und die Blutbahnen und die erneute Adhäsion an einer anderen Stelle.

Da bisher keine Daten darüber vorlagen, welche Rho-Proteine in Melanomzellen exprimiert werden, wurde dies mit Hilfe von spezifischen Antikörpern im Western-Blot auf Proteinebene untersucht. Die Expression von RhoA, RhoB, RhoG, Rac1 und Cdc42 konnte hier nachgewiesen werden. Das Rho-Protein Rac2 wurde dagegen nicht gefunden. Da dessen Expression auf Zellen der hämatopoetischen Linie beschränkt sein soll (Dorseuil et al. 1996; Roberts et al. 1999), entsprach dies auch der Erwartung.

Das Toxin B aus *Clostridium difficile* inaktiviert Rho-Proteine durch Monoglucosylierung. Durch den Einsatz dieses Toxins wurde in dieser Arbeit die Rolle von Rho-Proteinen bei der Proliferation der Melanomzellen untersucht.

Die zeit- und konzentrationsabhängige Modifizierung der Rho-Proteine in Hs294T-Melanomzellen durch Toxin B wurde hier durch Glucosylierungs- und ADP-Ribosylierungsversuche nachgewiesen. Neben Rho (RhoA, RhoB und RhoC) wurden auch RhoG-, Rac1- und Cdc42-Proteine modifiziert. Diese Modifizierungen bewirkten bei den Melanomzellen eine Abnahme der Proliferation.

## 5 Schlussfolgerungen

Melanozyten sorgen über die Wechselwirkung mit Keratinozyten für die Bräunung der Haut. Diese Bräunung ist ein Schutzmechanismus gegen intensive Sonneneinstrahlung. Transformierte Melanozyten bzw. Melanomzellen vermehren sich jedoch unkontrolliert und führen zum malignen Melanom (McKee 1996).

Eine erfolgreiche Therapie dieses Tumors ist derzeit nur durch operative Entfernung des Primärtumors vor der ersten Metastasierung möglich. Eine kurative Therapie des malignen Melanoms nach Bildung von Metastasen gibt es zurzeit nicht. Chirurgische Maßnahmen, Chemotherapie, Radiatio und immuntherapeutische Maßnahmen haben in diesem Stadium nur palliativen Charakter (Garbe und Eigentler, 2004).

Mit dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass auch in Melanomzellen die durch Pertussistoxin inaktivierbaren  $G\alpha_i$  Proteine exprimiert werden. Durch ADP-Ribosylierung konnte diese Inaktivierung gezeigt und durch die Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde kann man davon ausgehen, dass in Melanomzellen die  $G\alpha_i$ -Protein-Subtypen durch Pertussistoxin ADP-ribolysiert werden und dadurch die Fähigkeit zur Zellproliferation abnimmt.

Zum anderen konnten auch die kleinen G-Proteine der Rho-Familie (RhoA, RhoB, RhoG, Rac1 und Cdc42) in Melanomzellen nachgewiesen werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese G-Proteine durch Toxine so modifiziert werden können, dass es zu einer Abnahme der Proliferation in Melanomzellen kam.

Die mit dieser Arbeit nachgewiesene selektive Ausschaltung von essentiellen Signaltransduktionsproteinen in Melanomzellen könnte ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapieoptionen beim malignen Melanom sein.

## Literaturverzeichnis

Abdel-Naser, M.B., Krasagakis, K., Garbe, C., Eberle, J. 2003. Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanozytes in response to UVB and UVA light. *Photodermatol.-Photoimmunol.-Photomed.*, 19:122-127.

Adamson, P., Paterson, H.F., Hall, A. 1992. *Intracellular localization of the P21rho proteins*. *J. Cell Biol.*, 119: 617-627.

Aktories, K., Mohr, C., Koch, G. 1992. *Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 175: 115-131.

Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y., Stack, M.S. 1998. *Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells*. *J. Biol. Chem.*, 273: 143-149.

Baggiolini, M., Boulay, F., Badwey, J.A., Curnutte, J.T. 1993. *Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst*. *Faseb J.* 7: 1004-1010.

Barbacid, M. 1990. *ras oncogenes: their role in neoplasia*. *Eur. Clin. J. Invest*, 20: 225-235.

Becker, D., Meier, C.B., Herlyn, M. 1989. *Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor*. *EMBO J.*, 8: 3685-3691.

Becker, D., Lee, P.L., Rodeck, U., Herlyn, M. 1992. *Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation*. *Oncogene*, 7: 2303-2313.

Bokoch, G.M., Bohl, B.P., Chuang, T.H. 1994. *Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins*. J. Biol. Chem., 269: 31674-31679.

Bourne, H.R. 1997. *How receptors talk to trimeric G proteins*. Curr. Opin. Cell Biol. 9:134-142.

Bretscher, A. 1999. *Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family*. Curr. Opin. Cell Biol., 11: 109-116.

Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N., Johnson, G.L. 1995. *G $\alpha_{12}$  und G $\alpha_{13}$  stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly*. J. Biol. Chem., 270: 24631-24634.

Cannon-Carlson, S., Tang, J. 1997. *Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels*. Anal. Biochem., 246: 146-148.

Chang, E.H., Gonda, M.A., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., Lowy, D.R. 1982. *Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 79: 4848-4852.

Cotran, R.S., Mayadas-Norton, T. 1998. *Endothelial adhesion molecules in health and disease*. Pathol. Biol., 46: 164-170.

Damaj, B.B., Mc Coll, S.R., Neote, K., Songquin, N., Ogborn, K.T., Hebert, C.A., Nacchache, P.H. 1996. *Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops*. 10: 1426-1434.

De Luca, M., Pellegrini, G., Zambruno, G., Marchisio, P.C. 1994. *Role of integrins in cell adhesion and polarity in normal keratinocytes and human skin pathologies*. J. Dermatol., 21: 821-828.

Dorseuil, O., Reibel, L., Bokoch, G.M., Camonis, J., Gacon, G. 1996. *The Rac target NADPH oxidase p67<sup>phox</sup> interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1*. J. Biol. Chem., 271: 83-88.

Elangbam, C.S., Qualls, C.W.J., Dahlgren, R.R. 1997. *Cell adhesion molecules-update*. Vet. Pathol., 34: 61-73.

Fiorentini, C., Donelli, G., Matarrese, P., Fabbri, A., Paradisi, S., Boquet, P. 1995. *Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase*. Infect. Immun., 63: 3936-3944.

Fiorentini, C., Fabbri, A., Falzano, L., Fattorossi, A., Matarrese, P., Rivabene, Donelli, G. 1998. *Clostridium difficile toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells*. Infect. Immun., 66: 2660-2665.

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., Boquet, P. 1997. *Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine*. Nature., 387: 729-733.

Flatau, G., Landraud, L., Boquet, P., Bruzzone, M., Munro, P. 2000. *Deamidation of RhoA glutamine 63 by the Escherichia coli CNF1 toxin requires a short sequence of the GTPase switch 2 domain*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 267: 588-592.

Foster, R., Hu, K.Q., Lu, Y., Noian, K.M., Thissen, J., Settleman, J. 1996. *Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation*. Mol. Cell. Biol., 16: 2689-2699.

Ganguly, S., Murty, W., Samaniego, F., Reuter, V.E., Bosl, G.J., Chaganti, R.S. 1990. *Detection of preferential NRAS mutations in human male germ cell tumors by the polymerase chain reaction*. Genes Chromosomes Cancer, 1: 228-232.



Garbe, C, Blum, A. 2001. *Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide*. Skin Pharmacol. Appl. Physiology. 14: 280-290

Garbe, C., Orfanos, C.E. 1992. Epidemiology of malignant melanoma in central Europe: risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. Pigment Cell Res., Suppl 2: 285-294.

Garbe, C., Eigentler, T.K. 2004. Therapy of malignant melanoma at the stage of distant metastasis. Hautarzt. 55:195-213.

Genth, H., Hofmann, F., Selzer, J., Rex, G., Aktories, K., Just, I. 1996. *Difference in protein Substrate specificity between hemorrhagic toxin and lethal toxin from Clostridium sordellii*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 229: 370-374.

Gierschik, P. 1992. *ADP-ribosylation of signal-transducing guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 175: 69-96.

Guasch, R.M., Scambler, P., Jones, G.E., Ridley, A.J. 1998. *RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration*. Mol. Cell. Biol., 18: 4761-4771.

Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., Bollag, G. 1998. *Direct Stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by  $G\alpha_{13}$* . Science., 280: 2112-2114.

Hepler, J.R. & Gilman, A.G. 1992. *G-Proteins*. Trends Biochem. Sci, 17: 383-387.

Herrmann, C., Ahmadian, M.R., Hofmann, F., Just, I. 1998. Functional consequences of monoglucosylation of Ha-Ras at effector domain amino acid threonine 35. J. Biol. Chem., 273: 16134-16139.

Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., Aktories, K. 1997. *Localization of the glucosyltransferase activity of Clostridium difficile toxin B to the N-terminal part of the holotoxin*. J. Biol. Chem., 272: 11074-11078.

Hori, Y., Kikuchi, A., Isomura, M., Katayama, M., Miura, Y., Fujioka, H., Kaibuchi, K., Takai, Y. 1991. *Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins*. Oncogene., 6: 515-522.

Horiguchi, Y., Senda, T., Sugimoto, N., Katahira, J., Matsuda, M. 1995. *Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho*. J. Cell Sci., 108: 3243-3251.

Hsu, M.Y., Shih, D.T., Meier, F.E., Van Belle, P., Hsu, J.Y., Eider, D.E., Bück, C.A., Herlyn, M. 1998. *Adenoviral gene transfer of  $\beta_3$  integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma*. Am. J. Physiol., 153: 1435-1442.

Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N., Takai, Y. 1991. *Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation Inhibitor*. Oncogene., 6: 119-124.

Just, I., Fritz, G., Aktories, K., Giry, M., Popoff, M.R., Boquet, P., Hegenbarth, A., von Eichel-Streiber, C. 1994. *Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho*. J. Biol. Chem., 269: 10706-10712.

Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K. 1995a. *Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B*. Nature., 375: 500-503.

Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K. 1995b. *The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxinA) monoglucosylates the Rho proteins*. J. Biol. Chem., 270: 13932-13936.

Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G.A., Aktories, K. 1996. *Inactivation of Ras by Clostridium sordellii lethal toxin- catalyzed glucosylation*. J. Biol. Chem., 271: 10149-10153.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., Amano, M. 1999. *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu. Rev. Biochem, 68: 459-486.

Kelvin, D.J., Michiel, D.F., Johnston J.A., Lloyd, A.R., Sprenger H., Oppenheim J.J. & Wang J.M. 1993. *Chemokines and serpentine: The molecular biology of chemokine receptors*. J. Leuk. Biol., 54: 604-612.

Kikuchi, A., Kuroda, S., Sasaki, T., Kotani, K., Hirata, K., Katayama, M., Takai, D. 1992. *Functional interactions of stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins and their common Substrate small GTP-binding protein*. J. Biol. Chem., 267: 14611-14615.

Kiyono, M., Satoh, T., Kaziro, Y. 1999. G protein  $\beta\gamma$  subunit-dependent Rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras-GRF1/CDC25(Mm). Proc. Natl. Acad. Sei. U. S. A., 96: 4826-4831.

Kjoller, L., Hall, A. 1999. *Signaling to Rho GTPases*. Exp. Cell Res., 253: 166-179.

Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., Sternweis, P.C. 1998. *p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$* . Science., 280: 2109-2111.

Kupper, R.W, Dewald, B., Jakobs, K.H., Baggiolini, M. & Gierschik, P. 1992. *G-protein activation by interleukin-8 and related cytokines in human neutrophil plasma membranes*. Biochem. J., 282: 429-434.

Lerm, M., Selzer, J., Hoffmeyer, A., Rapp, U.R., Aktories, K., Schmidt, G. 1999. *Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: Activation of cJun N-terminal kinase in HeLa cells*. Infect. Immun., 67: 496-503.

Luan, J., Shattuck-Brandt, R.L., Haghnegahdar, H., Owen, J.D., Strieter, R., Burdick, M., Nirodi, C., Beauchamp, D., Johnson, K.N., Richmond, A. 1997. *Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression*. J. Leukoc. Biol., 62: 588-597.

Madaule, P., Axel, R. 1985. *A novel ras-related gene family*. Cell, 41: 31-40.

Marchisio, P.C., Trusolino, De Luca 1997. *Topography and biological role of integrins in human skin*. Micros. Res. Tech., 38: 353-360.

McKee, P.H. 1996. *Pathology of the Skin*. Mosby-Wolfe, London.

Mohr, C., Koch, G., Just, I., Aktories, K. 1992. *ADP-ribosylation by Clostridium botulinum C3 exoenzyme increases steady-state GTPase activities of recombinant rhoA and rhoB proteins*. FEBS Lett., 297: 95-99.

Montaner, S., Perona, R., Saniger, L., Lacal, J.C. 1998. *Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor  $\kappa$ B by the Rho family of GTPases*. J. Biol. Chem., 273: 12779-12785.

Natali, P.G., Hamby, C.V., Felding-Habermann, B., Liang, B., Nicotra, M.R., Di Filippo, F., Giannarelli, D., Temponi, M., Ferrone, S. 1997. *Clinical significance of  $\alpha_v\beta_3$  integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions*. Cancer Res., 57: 1554-1560.

Nemoto, Y., Namba, T., Kozaki, S., Narumiya, S. 1991. *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosyltransferase gene. Cloning, sequencing, and expression of a functional protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 266: 19312-19319.

Neudauer, C.L., Joberty, G., Tatsis, N., Macara, I.G. 1998. *Distinct cellular effects and interactions of the Rho-family GTPase TC10*. Curr. Biol., 8: 1151-1160.

Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, D.J., Cheresch, D.A., Brodt, P. 1992. *Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin  $\alpha_v\beta_3$  to adhere to lymph node vitronectin*. J. Clin. Invest., 90: 1406-1413.

Norgauer, J., Kownatzki, E., Seifert, R., Aktories, K. 1988. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and enhances O<sub>2</sub>-production and secretion but inhibits migration of activated human neutrophils. J. Clin. Invest., 82: 1376-1382.

Norgauer, J., Just, I., Aktories, K., Sklar, L.A. 1989. *Influence of botulinum C2 toxin on f-actin and N-formyl peptide receptor dynamics in human neutrophils*. J. Cell Biol., 109: 1133-1140.

Ohga, N., Kikuchi, A., Ueda, T., Yamamoto, J., Takai, Y. 1989. *Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 163: 1523-1533.

Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. Cell. Signal., 11: 545-554.

Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H.C., Fiorentini, C., Boquet, P., 1994. *Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent Escherichia coli modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 91: 3814-3818.

Patel, T.B. 2004. Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. Pharmacol. Rev. 56: 371-385

Pennington, S.R. 1995. GTP-binding proteins: heterotrimeric G proteins. *Protein Profile*, 2: 167-315.

Philips, A., Roux, P., Coulon, V., Beilanger, J.M., Vie, A., Vignais, M.L., Blanchard, J.M. 2000. *Differential effect of Rac and Cdc42 on p38 kinase activity and cell cycle progression of nonadherent primary mouse fibroblasts*. *J. Biol. Chem.*, 275: 5911-5917.

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., Narumiya, S. 1996. *Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain*. *J. Biol. Chem.*, 271: 13556-13560.

Roberts, A.W., Kim, C., Zhen, L., Löwe, J.B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J.D., Borneo, J.B., Bradford, G.B., Atkinson, S.J., Dinanuer, M.C., Williams, D.A. 1999. *Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense*. *Immunity*, 10: 183-196.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

Sasaki, T., Kato, M., Takai, Y. 1993. *Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21*. *J. Biol. Chem.*, 268: 23959-23963.

Satyamoorthy, K., Herlyn, M. 2002. *Cellular and molecular biology of human melanoma*. *Cancer Biol. Ther.* 9: 807-812.

Schadendorf, D., Möller, A., Algermissen, B., Worm, M., Sticherling, M. & Czarnetzki, B.M. 1993. *IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor*. *J. Immunol.*, 151: 2667-2675.

Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., Aktories, K. 1997. *Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1*. Nature., 387: 725-729.

Schraufstatter, I., Barritt, D.S., Ma, M., Oades, Z. & Cochrane, C.G. 1993. *Multiple sites on IL-8 responsible for binding to  $\alpha$  and  $\beta$  IL-8 receptors*. J. Immunol., 151: 6418-6428.

Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G., Di Fiore, P.P. 2000. *signaling from ras to rac and beyond: not just a matter of GEFs*. EMBO J., 19: 2393-2398.

Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Brown, J.H. 1999. *Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling*. Mol. Pharmacol., 55: 949-956.

Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., Aktories, K. 1998. *Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling*. Biochemistry, 37: 5296-5304.

Sekine, A., Fujiwara, M., Narumiya, S. 1989. *Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase*. J. Biol. Chem., 264: 8602-8605.

Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C., Weinberg, R.A. 1992. *Association between GTPase activators for Rho and Ras families*. Nature., 359: 153-154.

Shih, I.M., Herlyn, M. 1993. *Role of growth factors and their receptors in the development and Progression of melanoma*. J. Invest. Dermatol., 100: 196S-203S.

Shilo, B.Z., Weinberg, R.A. 1981. *Unique transforming gene in carcinogen-transformed mouse cells*. Nature., 289: 607-609.

Siegel, G., Malmsten, M. 1997. *The role of the endothelium in inflammation and tumor metastasis*. Int. J. Microcirc. Clin. Exp., 17: 257-272.

Singh, R.K., Gutman, M., Reich, R., Bar-Eli, M. 1995. *Ultraviolet B Irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8*. Cancer Res., 55: 3669-3674.

Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., Liotta, L.A. 1993. *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu. Rev. Cell Biol, 9: 541-573.

Strassheim, D., Porter, R.A., Phelps, S.H., Williams, C.L. 2000. *Unique in vivo associations with SmgGDS and RhoGDI and different guanine nucleotide exchange activities exhibited by RhoA, dominant negative RhoA(Asn-19), and activated RhoA(Val-14)*. J. Biol. Chem., 275: 6699-6702.

Sun, Y.J., Yamauchi, J., Kaziro, Y., Itoh, H. 1999. *Activation of c-fos promoter by G  $\beta$ -mediated signaling: Involvement of Rho and c-Jun N-terminal kinase*. J. Biochem., 125: 515-521.

Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H., Fukumoto, M. 1998. *Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas*. Br. J. Cancer, 77:147-152.

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., Takai, Y. 1997. *Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein*. J. Biol. Chem., 272: 23371-23375.

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Hotta, I., Takaishi, K., Imamura, H., Nakano, K., Kodama, A., Takai, Y. 1998. *Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein*. Oncogene., 16: 3279-3284.

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. 2001. *Small GTP-binding proteins*. Physiol. Rev. 81: 153-208



Tanabe, K., Tachibana, T., Yamashita, T., Che, Y.H., Yoneda, Y., Ochi, T., Tohyama, M., Yoshikawa, H., Kiyama, H. 2000. *The small GTP-binding protein TC10 promotes nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats*. J. Neurosci., 20: 4138-4144.

Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C. 1997. *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev., 11: 2295-2322.

Vincent, S., Jeanteur, P., Fort, P. 1992. Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family. Mol. Cell. Biol., 12: 3138-3148.

Wu, D., LaRosa, G.J. & Simon, M.I. 1993. G-protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. Science, 261: 101-103.

Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, Olofsson, B. 1995. *Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle*. Oncogene., 10: 1935-1945.

## Anhang

### Lebenslauf

Diana Bergner

Straße der Einheit 83a

07586 Kraftsdorf

Geburtsdatum: 04. 02.1979

Geburtsort: Gera

#### **Schule**

1985-1989: Grundschule Kraftsdorf

1989-1991: Polytechnische Oberschule Kraftsdorf

1991-1997: Friedrich-Schiller-Gymnasium Gera

06/1997: Abitur

#### **Universität**

1997-1999: Medizinstudium an der Universität Leipzig

09/1999: Ärztliche Vorprüfung

1999-2004: Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

08/2000: 1. Teil Ärztliche Prüfung

03/2003: 2. Teil Ärztliche Prüfung

04/2003-03/2004: Praktisches Jahr

12/2004: 3. Teil Ärztliche Prüfung und Erhalt der Approbation

04/2004-05/2005: Promotionsarbeit

# **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: L. Berod, M. Lagadari, Prof. J. Norgauer,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und  
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers